

Untersuchungen zur F-proteinvermittelten Fusion von Paramyxoviren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biophysikerin Bolormaa Baljinnyam

geb. am 24.06.1971 in Ulaanbaatar, Mongolei

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann

2. Prof. Dr. Klaus Arnoldt

3. Prof. Dr. Michael F.G. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2003

Zusammenfassung

Untersuchungen zur F-proteinvermittelten Fusion von Paramyxoviren

122 Seiten, 29 Abbildungen und 6 Tabellen

Bolormaa Baljinnyam, 2002, Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation

Die für die Vermehrung der Paramyxoviren notwendige Freisetzung des Virusgenoms in die Wirtszelle findet nach einer Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran statt. Die Membranfusion wird durch eine Konformationsänderung des membranständigen Fusionsproteins (F-Protein) der Paramyxoviren vermittelt. Der Auslöser der Strukturumwandlung des F-Proteins ist bislang unbekannt. Man nimmt an, daß eine Wechselwirkung mit dem zweiten membranständigen Protein der Hämagglutinin-Neuraminidase (HN-Protein) die Strukturumwandlung des F-Proteins induziert. Das F-Protein kann jedoch auch in Abwesenheit des HN-Proteins eine Membranfusion vermitteln. Für das Verständnis des Mechanismus der F-proteinvermittelten Fusion ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des F-Proteins notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden die F-Proteine der Paramyxoviren, Sendavirus und Simianvirus 5, in fusionskompetenter Form isoliert und in kleine Lipidvesikel rekonstituiert, um deren Struktur mittels Kryoelektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse aufzuklären. Die 3D-Struktur des Sendavirus-F-Proteins konnte mit einer Auflösung von 16 Å aufgeklärt werden.

Um geeignete Bedingungen herauszufinden, die das Auslösen der Konformationsänderung der F-Proteine bzw. das "Einfangen" von Strukturintermediaten während der Fusion ermöglichen, wurde das Fusionsverhalten von Sendavirus und Simianvirus 5 bei unterschiedlichen Temperatur- und pH-Werten sowie in Anwesenheit von Lysolipiden mittels Fluoreszenzdequenchingassays untersucht. Ein signifikanter Anstieg der Fusionsaktivität der untersuchten Viren konnte durch eine Erhöhung der Temperatur erreicht werden. Mittels ESR-Spektroskopie unter Einsatz von spinmarkierten Lysolipiden konnte gezeigt werden, daß Lysolipide die proteinvermittelte Fusion von Hüllviren in einem späten lipidabhängigen Schritt hemmen. Diese Untersuchungen bilden damit eine Grundlage zur Aufklärung der 3D-Struktur des F-Proteins im fusionsaktiven Zustand.

Desweiteren wurde die Rolle der transmembranalen und zytoplasmatischen Domäne des F-Proteins bei der Membranfusion und der Wechselwirkung mit dem HN-Protein mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Befunde der 3D-Strukturaufklärung und der fluoreszenzmikroskopischen Studien wurden unter anderem in Hinblick auf die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen den F- und HN-Proteinen für die Fusion diskutiert.

Schlagwörter: Paramyxovirus, Sendavirus, Simianvirus 5, 3D-Struktur, Fusionsprotein, F-Protein, HN-Protein, Membranfusion, Lysolipide, Fusionsintermediat, Lipidvermischung, Fusionspore, Transmembrandomäne, zytoplasmatische Domäne

Abstract

Paramyxoviruses infect their host cells by fusion of the viral envelope with the cell membrane. The membrane fusion is mediated by a conformational change of a viral envelope glycoprotein called the fusion (F) protein. The trigger of the F protein conformational change is still unknown. It is suggested, that an interaction of the F protein with the second envelope glycoprotein hemagglutinin-neuraminase (HN) induces its conformational change. However the F protein can mediate membrane fusion in absence of HN. The knowledge of the three dimensional structure of the F protein is required to understand the F mediated membrane fusion.

In the present work the fusion competent form of the fusion proteins of the paramyxoviruses Sendai virus and Simian virus 5 were isolated and incorporated each of them into small lipid vesicles. The 3D-structure of the entire ectodomain of the Sendai virus F protein has been determined in fusion potential conformation by cryo electron microscopy of single molecules and 3D-reconstruction at a resolution of ~ 16 Å.

To detect usefull conditions for triggering the conformational change of F, the fusion of Sendai virus and Simian virus 5 have been studied at different temperature and pH, respectively, using a fluorescence dequenching assay. A significant increase of virus fusion activity has been found due to temperature enhancement. Using ESR-spectroscopy and spin-labeled lysolipids it has been shown that lysolipids inhibit the protein mediated fusion of enveloped viruses at a late lipid-dependent intermediate. Thus lysolipids are capable to freeze a conformational intermediate of the F protein during fusion.

Furthermore the role of the transmembrane and the cytoplasmic domain of the Sendai virus F protein for membrane fusion was investigated using fluorescence microscopy. The results of the fluorescence microscopy study and the detection of the 3D-structure have been discussed in view of the relevance of F-HN-interaction for membrane fusion.

Keywords: Paramyxovirus, Sendai virus, Simian virus 5, fusion protein, 3D structure, F protein, HN protein, membrane fusion, lysolipids, fusion intermediate, lipidmixing, fusion pore, transmembrane domain, cytoplasmic domain

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1 Einführung.....	8
1.1 Aufbau und Vermehrung der Myxoviren	8
1.2 Spikeproteine des Influenzavirus.....	12
1.3 Spikeproteine des Sendaivirus und Simianvirus 5.....	14
1.4 Die Membranfusion	16
1.4.1 Die HA-vermittelte Fusion.....	16
1.4.2 Die F-proteinvermittelte Fusion	20
1.5 Inhibierender Einfluß von Lysolipiden auf die Membranfusion	23
1.6 Die Rolle der transmembranalen und intraviralen Domäne des Fusionsproteins bei der Membranfusion	24
2 Zielstellung.....	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Chemikalien und Lösungen	28
3.2 Biologisches Material	29
3.3 Anzucht und Reinigung der Viren.....	29
3.3.1 Vermehrung von Sendai- und Influenzaviren	29
3.3.2 Vermehrung von Simianvirus 5	30
3.3.3 Virusreinigung.....	30
3.4 Isolierung und Identifizierung der viralen Fusionsproteine.....	31
3.4.1 Isolierung des Sendaivirus-F-Proteins	31
3.4.2 Isolierung der Glykoproteine des Simianvirus 5.....	32
3.4.3 Bestimmung der Tritonmenge.....	33
3.4.4 SDS-PAGE.....	33
3.4.5 Chemisches Crosslinking	34
3.4.6 Hämolysetest	34
3.4.7 FDQ-Assay mit Sendaivirus-F-Virosomen.....	35

3.5	Fluoreszenzspektroskopische Messungen an Paramyxoviren	36
3.5.1	Markierung von Viren mit R18.....	36
3.5.2	Herstellung von offenen Erythrozyten-Ghosts.....	37
3.5.3	Fusionsassay und Datenanalyse	37
3.6	Überprüfung des Lysolipideinflusses auf die Fusion von Myxoviren sowie die Untersuchung der Wechselwirkung von Lysolipiden mit Influenzaviren	38
3.6.1	Untersuchung der Sendaivirus-Ghost-Fusion in Anwesenheit von Lysolipiden.....	38
3.6.2	Fusionsanalyse von Influenzaviren mit Ghosts in Anwesenheit von Lysolipiden.....	39
3.6.3	Präparation von Bromelain-behandelten Influenzaviren und Bromelain-gespaltener HA-Ektodomäne	40
3.6.4	Bindung von bis-ANS an BHA und Influenzaviren.....	40
3.6.5	Herstellung von SUVs.....	41
3.6.6	ESR-Messungen	42
3.7	Fluoreszenzmikroskopische Studien an exprimiertem Sendaivirus-F-Protein und dessen Chimären	43
3.7.1	Das pTM1/vTF7-3 Expressionssystem	43
3.7.2	Untersuchung der Zell-Zell-Fusion.....	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Isolierung des Sendaivirus-F-Proteins und Aufklärung seiner 3D-Struktur.....	49
4.1.1	Isolierung und Charakterisierung des SeV-F-Proteins.....	49
4.1.2	Überprüfung der Fusionsaktivität des isolierten SeV-F-Proteins	52
4.1.3	Optimierung der SeV-F-Virosomen für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur	54
4.1.4	Aufklärung der 3D-Struktur des SeV-F-Proteins.....	57
4.2	Isolierung und Identifizierung des Fusionsproteins des Simianvirus 5	58
4.3	Charakterisierung der Fusionsaktivität von Sendaivirus und Simianvirus 5	63
4.4	Einfluß von Lysolipiden auf die Fusion von Sendaiviren	68
4.5	Wechselwirkung von Lysolipiden mit Influenzavirus.....	70
4.5.1	Inhibierung der Influenzavirus-Fusion durch SL-LPC	71
4.5.2	Wechselwirkung von SL-LPC mit der HA-Ektodomäne.....	73

4.5.3 Wechselwirkung von SL-LPC mit Influenzaviren.....	77
4.6 Fluoreszenzmikroskopische Studien am exprimierten Sendaivirus-F-Protein und dessen Chimären.....	79
4.6.1 Notwendigkeit der Co-Expression von HN	79
4.6.2 Einfluß der Substitution der F-Domänen auf die Zell-Zell-Fusion.....	81
4.6.3 Untersuchung der Vakziniavirus-infizierten Zellen.....	84
5 Diskussion	85
5.1 Die 3D-Struktur des Sendaivirus-Fusionsproteins	85
5.2 Das Fusionsprotein des Simianvirus 5.....	89
5.3 pH- und Temperaturabhängigkeit der Fusionsaktivität von Paramyxoviren.....	90
5.4 Wechselwirkung von LPC mit Myxoviren.....	92
5.4.1 Einfluß von LPC auf die Fusion von Sendai- und Influenzaviren	92
5.4.2 LPC wechselwirkt mit der Virushülle und nicht mit der HA-Ektodomäne.....	93
5.5 Die Rolle der transmembranalen und zytoplasmatischen Domäne des Sendaivirus-F bei der Membranfusion	96
5.6 Die Funktion der Hämagglutinin-Neuraminidase bei der F-proteinvermittelten Membranfusion.....	100
Literaturverzeichnis	104
Anhang	119
Danksagung.....	120
Publikationen.....	121
Erklärung.....	122

Abkürzungen

3D	dreidimensional
Å	Angström (0.1 nm)
AS	Aminosäure(reste)
ASGP-R	Asialoglykoprotein-Rezeptor
BHA	durch Bromelain abgespaltene Ektodomäne des Hämagglutinins
bis-ANS	1,1'-bis(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonsäure
BPIV	Bovines Parainfluenzavirus
BSA	Bovines Serumalbumin
Calcein-AM	Acetomethylester des Calceins
CT	zytoplasmatische (Domäne)
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSP	Dithiobissuccinimidylpropionat
DTT	Dithiotriethol
EDTA	Ethylenglycoltetraacetatsäure
Ei-PC	Phosphatidylcholin aus Eigelb
ESR	Elektronenspinresonanz
F	Fusionsprotein
FCS	Fetales Kalbserum
FDQ	Fluoreszenzdequenching
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
Fwt	Wildtyp des Fusionsproteins
HA	Hämagglutinin
HAU	haemagglutinating unit: Hämagglutinationseinheit
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
Hk	Hämatokritwert
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase
HPIV	Humanes Parainfluenzavirus
HRC	C-terminale "heptad repeat"-Sequenz
HRN	N-terminale "heptad repeat"-Sequenz
HRSV	Humanes-Respiratory-Syncytial-Virus
LPC	Lysophosphatidylcholin
LUV	Large unilamellar vesicle: große unilamellare Vesikel
MM	Molmarker
MW	Molekularweight: Molekulargewicht
MWCO	Molekularweight Cut-off
NA	Neuraminidase
NaAc	Natriumacetat
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NDV	Newcastle-Disease-Virus
PBS	Phosphate buffered saline: Phosphatpuffer

PBS+	Phosphatpuffer mit 2 mM Ca^{2+} und 2 mM Mg^{2+}
PC	Phosphatidylcholin
pfu	Plaque forming unit
R18	Octadecylrhodamin-B-chlorid
RBC	Red blood cells: rote Blutkörperchen
Rh-PE	Triethylammoniumsalz von N-(Lissamin tm rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SeV	Sendaivirus
SH	Small hydrophobic protein
SL-LPC	spinlabeled (spinmarkiertes) Lysophosphatidylcholin
SV5	Simianvirus 5
SUV	Small unilamellar vesicle: kleine unilamellare Lipidvesikel
TM	transmembranale (Domäne)
WGA	Wheat germ agglutinine: Weizenkeimagglutinin

1 Einführung

Die Fusion biologischer Membranen ist ein essentieller Schritt vieler zellulärer Prozesse. So sind zum Beispiel Transportvorgänge hochmolekularer Stoffe in einer Zelle (Exo- und Endozytose) mit einer Membranfusion gekoppelt. Sie ermöglicht außerdem die Verschmelzung der Gameten im Rahmen der geschlechtlichen Fortpflanzung oder der Myoblasten während der Myogenese, bei der sich vielkernige Skelettmuskelzellen bilden. Auch für Viren, die von einer Lipiddoppelschicht als Hülle umgeben sind, ist die Fusion von großer Bedeutung. Die für die Vermehrung dieser Viren notwendige Freisetzung des Virusgenoms in die Wirtszelle findet nach einer Verschmelzung der Virushülle mit der Zell- bzw. Endosomenmembran statt. Diese Membranfusion wird von viruskodierten Glykoproteinen, die aus der Virushülle herausragen, vermittelt. Oft werden diese umhüllten Viren zur Untersuchung von proteinvermittelten Fusionsprozessen eingesetzt. Sie lassen sich gut manipulieren und sind leicht in der Handhabung. Außerdem dienen Untersuchungen der Mechanismen der Virusinfektion zur Entwicklung besserer Schutz- und Therapiemöglichkeiten von Viruserkrankungen. Die Erkenntnisse über virale Glykoproteine und proteinvermittelte Fusion führen heutzutage soweit, daß sie als Transfersysteme neue Wege und Technologien in Medizin und Gentherapie zur Behandlung anderer Krankheiten öffnen.

1.1 Aufbau und Vermehrung der Myxoviren

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Hüllviren Sendavirus, Simianvirus 5 und Influenzavirus A. Das Sendavirus (hemagglutinating virus of Japan; Murines Parainfluenzavirus Typ I) aus der Familie Paramyxoviridae (Gattung Respirivirus) wurde 1952 erstmalig in Sendai (Japan) isoliert. Es verursacht bei Mäusen eine akute Lungenentzündung. Das Simianvirus 5 (Simian Parainfluenzavirus 5) gehört der Gattung

Rubulavirus der Familie Paramyxoviridae an und verursacht bei Hunden Atemwegskrankheiten wie Husten. Das Influenzavirus A aus der Familie Orthomyxoviridae ist bekanntlich für Grippeepidemien und –pandemien beim Menschen verantwortlich. Außerdem ist es auch tierpathogen (Vögel, Säuger). Die Paramyxo- und Orthomyxoviren werden unter dem Begriff Myxoviren zusammengefaßt.

Die Myxoviren besitzen Einzelstrang-RNA in Negativstrangorientierung. Bei Orthomyxoviren liegt die RNA im Gegensatz zu den Paramyxoviren in mehreren Segmenten vor. Die RNA bildet zusammen mit einigen viralen Proteinen (siehe Tab. 1.1, 1.2) das Nukleokapsid, das von einer Lipiddoppelschicht umhüllt wird. Die Virushülle besteht aus Lipiden der Wirtszellmembran und unterschiedlichen viruskodierten Proteinen (siehe Tab. 1.1 und Tab. 1.2). An der intraviralen Seite der Hülle bildet ein Matrixprotein eine elektronendichte Schale und verbindet das Nukleokapsid mit der Lipiddoppelschicht. Das Sendaivirus (SeV) und das Simianvirus 5 (SV5) haben zwei Arten von membranständigen Glykoproteinen: die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) und das Fusionsprotein (F). Diese Proteine ragen weit aus der Membran und sind im Elektronenmikroskop als „Spikes“ sichtbar, daher werden sie auch Spikeproteine genannt. Das Influenzavirus besitzt drei integrale Membranproteine: das Matrixprotein M2, die Neuraminidase (NA) und das Hämagglutinin (HA). Die letzten beiden sind glykolisierte Spikeproteine. Die viralen Glykoproteine sind Hauptantigene für die Immunantwort und daher von besonderer Bedeutung für Diagnostik, Therapie und Prophylaxe (Vakzinierung) von viralen Infektionen. Es sind auch Nichtstrukturproteine vorhanden, wie NS1 und NS2 bei Influenza, das C-Protein des SeV oder die V- und SH-Proteine des SV5. Das SH-Protein (small hydrophobic protein) besitzen nicht alle Paramyxoviren. Bis jetzt wurden nur bei SV5, Respiratory-Syncytial-Virus und Mumpsvirus das SH, das Merkmale eines membranassoziierten Proteins hat, gefunden (*Hiebert et al., 1988; Heminway et al., 1994*). Interessanterweise treten nach einer SV5-Infektion von MDBK-Zellen sehr geringe und verzögerte zytopathische Effekte auf, offenbar ist das SH bei der Hemmung der Apoptose in den Zellen beteiligt (*He et al., 2001*).

Die Hüllviren vermehren sich ausschließlich in lebenden Zellen. Die Infektion der Wirtszelle erfolgt bei Para- und Orthomyxoviren in mehreren Etappen, die sich am Anfang wesentlich voneinander unterscheiden (Abb. 1.1.1). Der erste Schritt ist die Bindung (Attachment) der Viren an die sialinsäurehaltigen Rezeptoren der Targetmembran. Diese Bindung wird bei Influenzaviren durch das HA und bei SeV bzw. SV5 durch das HN

Tab. 1.1: Charakterisierung der Proteine des Influenzavirus A. Die Molekulargewichte der Proteine wurden aus der Datenbank Swiss-Prot entnommen.

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Eigenschaft	Funktion
HA	75-80	glykolisiertes Membranprotein Typ I; Trimer	Bindung an Neuraminsäure, Hämagglutination; Fusions- und Hämolyseaktivität
NA	55-70	glykolisiertes Membranprotein Typ II; Tetramer	Neuraminidaseaktivität (Abspaltung endständiger Neuraminsäurereste und Ablösung neugebildeter Virionen)
M1	25	Matrixprotein	Verbindung zwischen Nukleokapsid und Virushülle; Stabilisierung der Virushülle; Morphogenese
M2	15	integrales Membranprotein	pH-regulierender Ionenkanal
PB1	96	Nukleokapsiduntereinheit	RNA-abhängige RNA-Polymerase
PB2	87	Nukleokapsiduntereinheit	RNA-Polymerase; Bindung an 5'-Cap-Strukturen
PA	85	Nukleokapsiduntereinheit; sauer	Komponente der RNA-Polymerasecomplexes
NP	50-60	Hauptkomponente des Nukleokapsids; basisch	Kerntransportsignal
NS1	25	Nichtstrukturprotein im Nukleokapsid	Cofaktor beim RNA-Spleißen, reguliert Export der gespleißten RNA
NS2	12	Nichtstrukturprotein im Nukleokapsid	regulatorisches Protein

vermittelt. Die Influenzaviren werden nach der Bindung von der Wirtszelle endozytiert. Die Freisetzung des Virusgenoms in das Zellplasma erfolgt durch die HA-vermittelte Verschmelzung der Virushülle mit der endosomalen Membran nach Ansäuerung des endosomalen Lumens (*Doms et al., 1985; Hoekstra, 1989*). Bei SeV und SV5 fusioniert die Virushülle direkt mit der Plasmamembran in neutralem Milieu (pH~7.4), wobei die Membranfusion vom F-Protein vermittelt wird. Die weiteren Schritte der Replikation sind bei

Tab. 1.2: Charakterisierung der Proteine des Sendaivirus, Stamm Z (SeV) und Simianvirus 5, Stamm W3 (SV5). Die Angaben zum Molekulargewicht wurden aus der Datenbank Swiss-Prot entnommen. (-) - das Protein ist beim entsprechen Virus nicht vorhanden.

Protein	Molekulargewicht (kDa)		Eigenschaften	Funktion
	SeV	SV 5		
F	59	55	glykolisiertes Membranprotein Typ I; Trimer	Fusions- und Hämolyseaktivität
HN	63	62	glykolisiertes Membranprotein Typ II; Tetramer	Adsorption, Hämagglutination; Neuraminidaseaktivität
M	38.6	42	Matrixprotein	Verbindung zwischen Nukleokapsid und Virushülle; Stabilisierung der Virushülle
NP	56.8	56.5	Nukleokapsidprotein; Wechselwirkung mit M	verantwortlich für die korrekte Faltung und Verpackung des Nukleokapsids
L	253	256	Nukleokapsiduntereinheit	RNA-abhängige RNA-Polymerase; Proteinkinase
P	62	42	Nukleokapsiduntereinheit, phosphoryliert	RNA-abhängige RNA-Polymerase
C	24	-	Nichtstrukturprotein	Hemmung der Genomtranskription
V	-	24	Nichtstrukturprotein	Insertion von G-Resten durch RNA-Editing
SH	-	5	Nichtstrukturprotein (small hydrophobic protein)	Hemmung der Apoptose der Wirtszellen

den Myxoviren sehr ähnlich. Da sie eine Negativstrang-RNA haben, muß das Genom zunächst in einen komplementären Plusstrang transkribiert werden. Alle drei mit der Nukleinsäure komplexierten Proteine (bei Influenza: PA, PB1, PB2; bei SeV bzw. SV 5: L, P, NP) sind für den Ablauf der Transkription notwendig. Die RNA-Replikation findet im Zellkern statt, wogegen die gleichzeitige Proteinsynthese im Zytoplasma abläuft. Die membranständigen Proteine werden anschließend im Golgi-Apparat modifiziert und zur Zelloberfläche transportiert. Die Nukleokapsidproteine werden in den Zellkern transportiert. Dort wird der Ribonukleoprotein-Komplex verpackt und an der Plasmamembran der

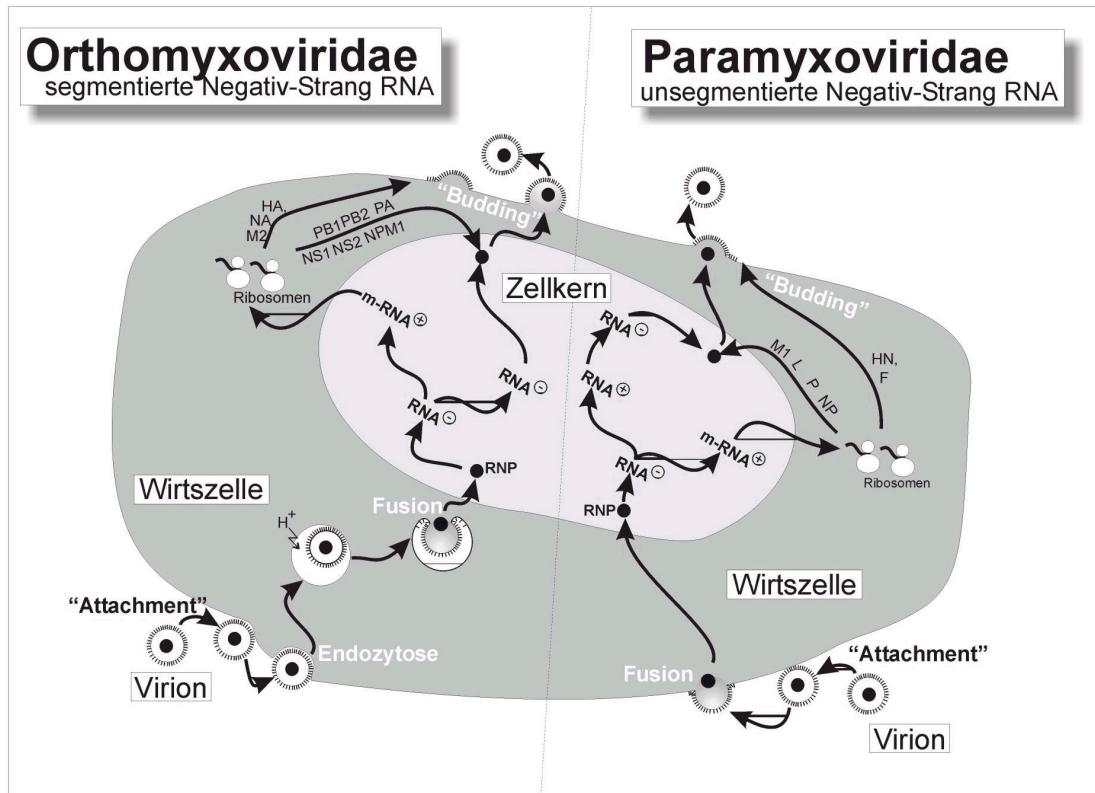


Abb. 1.1.1: Schematische Darstellung des Vermehrungszyklus von Ortho- und Paramyxoviren. Weitere Details siehe Text. Mit freundlicher Genehmigung von K.Ludwig.

1.2 Spikeproteine des Influenzavirus

Das Influenzavirus A besitzt zwei Spikeproteine: die Neuraminidase (NA) und das Hämagglutinin (HA). Die tetramerische Neuraminidase kann Sialinsäuremoleküle von der Oberfläche der Zellen oder Viruspartikeln abspalten. Diese Spaltungsreaktion ermöglicht die Trennung neugebildeter Viruspartikeln von der Wirtszelle. Die NA entfernt auch die

Sialinsäure vom HA-Protein selbst und verhindert so die Zusammenlagerung der Viren aneinander (*Levine, 1993*). Die dreidimensionale Struktur der NA wurde 1983 mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt (*Varghese et al., 1983*).

Das Hämagglutinin vermittelt sowohl die Bindung der Viren an sialinsäurehaltige, zelluläre Rezeptoren als auch die Fusion der Virushülle mit der Targetmembran (*Wiley und Skehel, 1987; White, 1992*). Es wird zunächst als fusionsinaktives Vorläuferprotein HA0 synthetisiert, das glykolisiert und trimerisiert vorliegt. Die fusionskompetente Form des HA-Trimers entsteht nach der Spaltung des HA0 durch zelleigene Proteasen im *trans*-Golgi-Netzwerk. Jedes Monomer des membranständigen HA-Trimers besteht dann aus zwei Untereinheiten HA1 und HA2, die durch eine Disulfidbrücke kovalent aneinander gebunden sind. HA1 trägt die Rezeptorbindungsstelle und bildet den globulären Kopf und einen Teil des fibrinogenen Stammes der HA-Ektodomäne, den Stamm bildet HA2. Außerdem beinhaltet HA2 die transmembranale Domäne aus 24-28 ungeladenen, hydrophoben Aminosäuren und die C-terminale intravirale Domäne. Am N-Terminus des HA2 befindet sich das sogenannte Fusionspeptid, das innerhalb der Virusfamilie hochkonserviert ist. Es besteht aus ca. 24 hydrophoben Aminosäuren und spielt eine essentielle Rolle bei der Fusionsvermittlung durch das HA (*White, 1990*). Punktmutationen in dieser Sequenz führen zu einer drastischen Reduktion der Fusionsaktivität des HA (*Daniels et al., 1985; Gething et al., 1986; Steinhauer et al., 1995*). Das Fusionspeptid befindet sich in einem Abstand von ca. 30 Å über der Virushülle und ist zum hydrophoben Kern des HA-Trimers orientiert (*Wilson et al., 1981*).

Die gesamte Ektodomäne ragt etwa 135 Å aus der Membran und kann durch eine Bromelainbehandlung abgespalten werden. Die so isolierte HA-Ektodomäne (BHA, „bromelain-cleaved“ HA) konnte auskristallisiert werden, und die Röntgenkristallstruktur des BHA mit einer Auflösung von 3 Å bei neutralem Milieu bestimmt werden (*Wilson et al., 1981*). Allerdings ist diese Struktur des HA nicht fusiogen. Bei niedrigen pH-Werten (5-6) findet eine irreversible Konformationsumwandlung des HA statt. Nur nach dieser Strukturänderung ist das HA in der Lage eine Membranfusion zu induzieren (mehr dazu siehe Abschnitt 1.4.1).

1.3 Spikeproteine des Sendaivirus und Simianvirus 5

SeV und SV5 haben jeweils zwei Spikeproteine. Die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) besitzt sowohl eine Hämagglutinin- als auch eine Neuraminidaseaktivität. Sie vermittelt die Bindung der Viren an sialinsäurehaltige, zelluläre Rezeptoren sowie die Ablösung und Freisetzung neugebildeter Viruspartikeln (*Huberman et al., 1995*). Die HN-Moleküle liegen in der Virushülle oligomerisiert vor, wobei die Untereinheiten der Dimere über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Ausbildung von Tetrameren hingegen erfolgt durch nichtkovalente Bindung zwischen den Dimeren (*Markwell und Fox, 1980; Parks und Lamb, 1990*). Die Struktur des globulären Kopfs der HN-Ektodomäne eines Paramyxovirus, des Newcastle-Disease-Virus (NDV), konnte mittels Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 2.5 Å aufgeklärt werden (*Crennell et al., 2000*). Man nimmt an, daß an der gleichen Stelle des HN-Moleküls sowohl die Bindung als auch die Hydrolyse der Sialinsäuren stattfindet und die Funktion durch den Zustand der HN-Struktur bestimmt wird (*Crennell et al., 2000; Connaris et al., 2002*).

Das zweite Spikeprotein des SeV und SV5 ist das Fusionsprotein (F-Protein). Es vermittelt die Verschmelzung der Virushülle mit der Membran der Wirtszelle und ist ebenfalls für die Hämolyse sowie Zell-Zell-Fusion verantwortlich (*Scheid und Choppin, 1974*). Die Fusionsproteine des SeV und SV5 sind glykolisiert, und die Kohlenhydrateinheiten haben endständige Galaktose (*Yoshima et al., 1981; Prehm et al., 1979*). Das SeV-F bzw. SV5-F hat viele Gemeinsamkeiten mit dem Influenza-HA. Es wird ebenfalls als nichtfusiogenes Vorläuferprotein F0 (~60 kDa) synthetisiert, das im *trans*-Golgi-Netzwerk durch trypsin-ähnliche zelluläre Proteasen in die fusionskompetente Form F1+F2 gespalten wird (*Yoshima et al., 1981; Prehm et al., 1979*). Dabei findet eine signifikante Strukturänderung des F-Proteins statt (*Hsu et al., 1981; Scheid und Choppin, 1974; Dutch et al., 2001*). Die entstandenen Untereinheiten F1 und F2 sind miteinander durch eine Disulfidbrücke verbunden (Abb. 1.3.1). Die F2-Untereinheit befindet sich außerhalb der Virushülle. Über das C-terminale Ende der F1-Untereinheit ist das F-Protein in der viralen Membran verankert. Die transmembranale Domäne besteht aus 23 meist hydrophoben Aminosäuren. Die darauffolgende intravirale Domäne der Paramyxoviren ist unterschiedlich lang. Am neu gebildeten N-Terminus der F1-Untereinheit befindet sich das Fusionspeptid aus

25 hydrophoben Aminosäuren (*Homma und Ohuchi, 1973; Gething et al., 1978; Scheid und Choppin, 1977*). Ähnlich wie bei Influenza-HA ist das Fusionspeptid hochkonserviert und Punktmutationen des Fusionspeptids beeinflussen die Fusionsaktivität des F-Proteins (*Bagai und Lamb, 1997*). Außerdem sind zwei "heptad repeat" Sequenzen (HR) vorhanden, wobei die eine Sequenz unmittelbar nach dem Fusionspeptid folgt (HRN, N-terminal F1) und die andere Sequenz vor der transmembranalen Domäne lokalisiert ist (HRC, C-terminal F1). Das Fusionspeptid, die HRN und die HRC spielen eine entscheidende Rolle bei der Membranfusion (siehe Abschnitt 1.4).

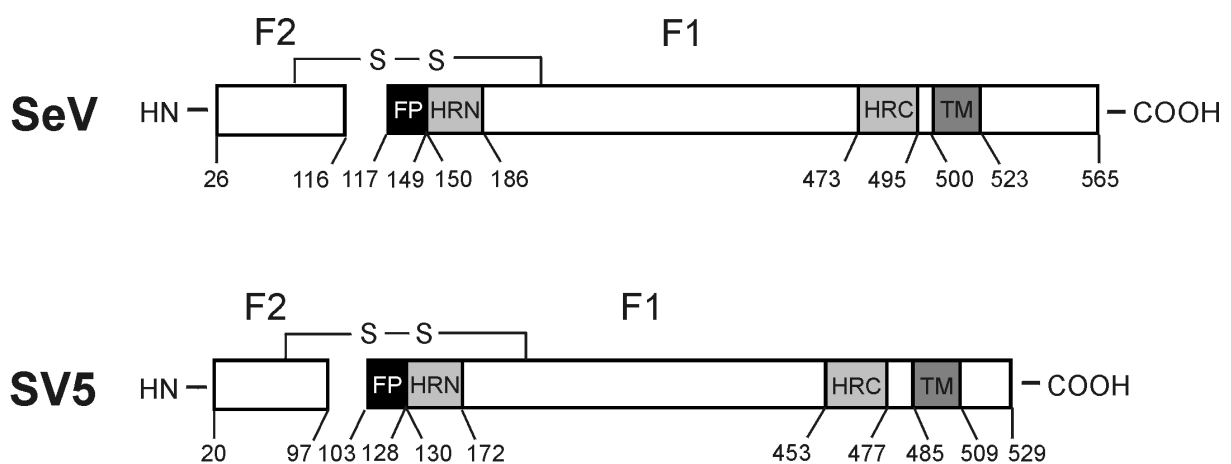


Abb. 1.3.1: Schematische Darstellung der Monomere des SeV-F und des SV5-F. FP: Fusionspeptid, HRN: "heptad repeat" N-terminal, HRC: "heptad repeat" C-terminal, TM: transmembranale Domäne, -S-S-: Disulfidbrücke zwischen F1 und F2. Die Numerierung entspricht der Aminosäuresequenz der Vorläuferproteine.

Die Oligomerstruktur des SeV-F wurde mittels homobifunktionaler Crosslinker bestimmt (*Sechoy et al., 1987*). Nach dem Crosslinking wurden neben Monomeren mit einem Molekulargewicht von ~60 kDa Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ~120 kDa identifiziert. Folglich wurde angenommen, daß SeV-F ein Homotetramer aus zwei Dimeren ist. Aber spätere Untersuchungen an F-Proteinen anderer Paramyxoviren, wie des SV5, des NDV und des Human-Parainfluenza-Virus 3 (HPIV3) mit Hilfe homobifunktionaler Crosslinker und Saccharosegradienten ergaben, daß das F-Protein der untersuchten Viren als Homotrimer organisiert ist (*Russel et al., 1994*). Wahrscheinlicher ist daher die Annahme, daß das SeV-F ebenfalls ein Homotrimer ist (siehe auch "Ergebnisse" und "Diskussion").

Die dreidimensionalen (3D) Strukturen des SeV-F und SV5-F sind nicht bekannt. Die

3D-Struktur des NDV-F-Proteins wurde 2001 mittels Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 3.3 Å aufgeklärt (*Chen et al., 2001*). Dabei handelt es sich um einen Teil der trimeren F-Ektodomäne oberhalb der HRC. Das NDV-F besteht aus einem zur Virushülle distalen Kopf, einer mittleren Hals- und einer zur Virushülle proximalen Stielregion. Obwohl für die Kristallisation das NDV-F in der F0-Form exprimiert wurde, konnte mittels SDS-PAGE festgestellt werden, daß F0 proteolytisch gespalten war. Da nach der Umwandlung des F0 in die F1+F2-Form eine Konformationsänderung des F-Proteins stattfindet, ist noch unklar inwieweit diese Spaltung die Kristallstruktur beeinflusst hat und welchem Zustand des F-Proteins die Kristallstruktur entspricht. Daher gibt es bislang keine eindeutigen Informationen über die 3D-Struktur des F-Proteins eines Paramyxovirus.

1.4 Die Membranfusion

Die Fusion biologischer Membranen ist ein komplexer Vorgang, der mehrere Schritte umfaßt. Der genaue Mechanismus der Membranverschmelzung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es existieren eine Reihe von Modellen für die proteinvermittelte Membranfusion (siehe Übersichtsartikel *Jahn und Grubmüller, 2002*). Einigen dieser Modelle lagen Untersuchungen an Hüllviren, insbesondere Inflenzaviren, zugrunde. Daher soll im folgenden Abschnitt auf die wesentlichen Schritte der HA-vermittelten Fusion näher eingegangen werden.

1.4.1 Die HA-vermittelte Fusion

Damit das HA eine Fusion vermitteln kann, bedarf es zwingend einer Konformationsänderung. Diese Strukturumwandlung wird durch eine pH-Erniedrigung induziert (*White et al., 1982*). Wie oben beschrieben, werden Inflenzaviren in vivo nach der Bindung an Wirtszellen endozytiert. Während der Reifung der Endosomen wird das Endosomenlumen durch Protonenpumpen angesäuert, was die nötige pH-Erniedrigung für die Induktion der Konformationsumwandlung des HA-Proteins. *In vitro* kann man den

Endozytoseweg umgehen, und die Influenzaviren nach der Bindung an eine geeignete Targetmembran durch die Erniedrigung des pH-Wertes des umgebenden Mediums zur Fusion veranlassen. Die Energie für die Umstrukturierung des HA wird aber nicht ausschließlich durch die pH-Wert-Erniedrigung geliefert. Ein Hauptteil der nötigen Energie wird wahrscheinlich schon bei der Faltung des HA analog einer gespannten Falle gespeichert (*Stuart, 1994*). Die pH-neutrale, fusionsinaktive Konformation des HA entspricht einem metastabilen Zustand. Die pH-Erniedrigung stellt lediglich den Schalter für die Konformationsumwandlung dar. Man nimmt an, daß die Protonierung die Wechselwirkung zwischen den HA1-Untereinheiten des HA-Trimers schwächt (*Huang et al., 2002*). Dadurch wird eine Reorganization der HA1-Domänen erreicht, die essentiell für die weitere HA-Strukturänderung ist (*Godley et al., 1992; Kemble et al., 1992; Böttcher et al., 1999; Ludwig, 2000; Huang et al., 2002*).

In einer Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe und dem Forschungszentrum für Elektronenmikroskopie, FU Berlin, konnte die 3D-Struktur des HA sowohl im fusionsinaktiven als auch fusionsaktiven Zustand mittels Einzelpartikelanalyse kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen mit einer Auflösung von 10 Å bzw. 14 Å rekonstruiert werden (*Böttcher et al., 1999; Ludwig, 2000*). Obwohl nach pH-Erniedrigung die typische Oberflächenstruktur des trimeren HA erhalten blieb, unterscheidet sich die fusionsaktive Struktur von der inaktiven durch die Abflachung der Kopfsenden der HA1-Domänen und die Bildung eines Kanals durch das gesamte Trimer. Man nimmt an, daß die Reorganisation der HA1-Domänen und die Bildung eines zentralen Kanals genügend Raum für die Bildung der "coiled-coil"-Struktur bietet (*Böttcher et al., 1999; Ludwig, 2000; Huang et al., 2002*). Diese trimere "coiled-coil"-Struktur entsteht nach dem "spring-loaded" Mechanismus durch einen Loop-zu-Helix-Übergang im HA2 (*Carr und Kim, 1993*). Dabei geht der Loop im HA2 zu einem α -Helix über und das neu entstandene durchgehende Helix wird zum Bestandteil einer sogenannten "extended coiled-coil"-Struktur (Abb. 1.4.1 A, B der Loop ist durch eine schwarze Schleife bzw. durch ein schwarzes Stäbchen dargestellt). Das Fusionspeptid wird durch diese Umfaltung der HA2-Untereinheit aus dem Inneren des HA-Trimers Richtung des zur Virushülle distalen Ende exponiert. Anschließend tauchen die Fusionspeptide in die Targetmembran ein (Abb. 1.4.1 B). Durch FTIP-Messungen mit dem isolierten Fusionspeptid konnte gezeigt werden, daß das Fusionspeptid mit der Targetmembran nicht nur in Kontakt tritt (*Harter et al., 1989; Stegmann et al., 1991*), sondern

auch in einem definierten Winkel schräg in die Membran eintaucht (*Lüneberg et al., 1995*).

Im nächsten Schritt der Konformationsänderung beugt sich das Fusionsprotein um eine "Scharnierregion" durch einen Helix-zu-Loop-Übergang im HA2. Dabei binden sich α -Helices am N-terminalen Ende des HA-Trimers an α -Helices am C-terminalen Ende und

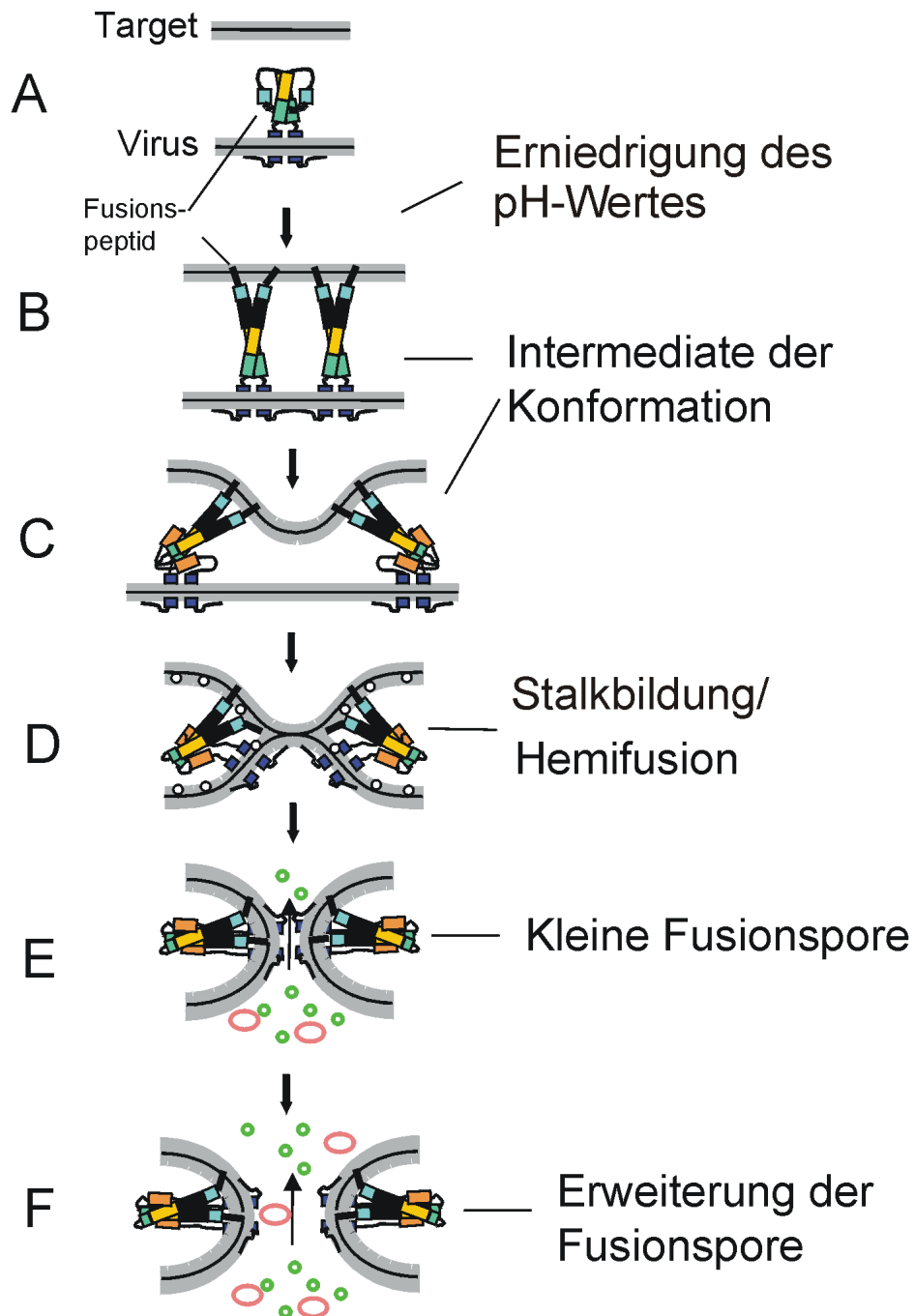


Abb. 1.4.1: Schritte der HA-vermittelten Membranfusion. Zur besseren Übersicht wurden nur zwei Monomere gezeigt. Weitere Details siehe Text. Mit freundlicher Genehmigung von A. Herrmann.

bilden ein Sechs-Helix-Bündel aus antiparallelen "coiled-coil" (Abb. 1.4.1 C) (*Bullough et al., 1994; Chen et al., 1999*). Das antiparallele Helix-Bündel wurde nicht nur bei HA gefunden, sondern auch bei Fusionsproteinen unterschiedlicher Hüllviren wie des Retrovirus HIV-1 (Humanes-Immundefizienz-Virus), des Filovirus Ebolavirus und des Paramyxovirus SV5 (*Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997; Weissenhorn et al., 1998; Baker et al., 1999*). Man nimmt an, daß durch die Biegung des Fusionsproteins die nötige Annäherung der zu fusionierenden Membranen gewährleistet wird (Abb. 1.4.1 C). In neueren Studien wurde aber auch die Rolle der „extended coiled-coil“-Struktur, die in dem vorangegangenen Schritt gebildet wurde, für die Annäherung der Membranen diskutiert (*Qiao et al., 1998; Gruenke et al., 2002*). Eine HA-Mutante, die aufgrund einer Punktmutation im HA2 keine korrekte "extended coiled-coil"-Struktur ausbilden konnte, war nicht in der Lage eine Membranfusion zu induzieren, obwohl nach der Strukturumwandlung das Fusionspeptid exponiert wurde und in die Targetmembran eintaucht. Daher geht man davon aus, daß das Umknicken der gesamten "extended coiled-coil" zum Zusammenbringen der zu fusionierenden Membranen notwendig ist (*Gruenke et al., 2002*).

Das nächste identifizierte Fusionsintermediat ist die Hemifusion (Abb. 1.4.1 D). Mit einer HA-Mutante (GPI-HA), bei der die HA-Ektodomäne an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) als Lipidanker gebunden ist, läßt sich die Hemifusion beobachten (*Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995; Nüßler et al., 1997*). Dabei verschmelzen die jeweils äußeren Lipidmonolayer der beiden Membranen miteinander und bilden ein sogenanntes Stalk, eine halsähnliche Struktur mit einer negativen Krümmung. Die noch nicht fusionierten inneren Lipidlayer formen eine "Diaphragma". Die Hemifusion ist ein metastabiler Zustand und sehr kurzlebig. Anschließend folgt die Bildung einer frühen Fusionspore mit einer Porengröße von 1-2 nm (Abb. 1.4.1 E) (*Spruce et al., 1991*). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob diese Pore eine reine Proteinpore ist, die aus mehreren zusammengelagerten HA-Molekülen gebildet wird (*Almers, 1990; Tse et al., 1993*), oder ob die Pore von Beginn an lipidisch ist (*White, 1995; Chernomordik et al., 1995; Chernomordik et al., 1999*). Die frühen Poren können sich wiederholt öffnen und schließen ("flickering"). Schließlich findet eine irreversible Erweiterung der Fusionsporen statt (Abb. 1.4.1 F), wobei auch mehrere kleine Poren zu einer größeren Pore verschmelzen können. Der genaue Mechanismus der Porenerweiterung ist jedoch unklar.

1.4.2 Die F-proteinvermittelte Fusion

Bei Paramyxoviren ist der Auslöser für die Fusion unbekannt. Es gibt Hinweise, daß das HN-Protein in diesen Prozeß involviert ist. Man nimmt an, daß nach der Bindung des HN an Rezeptoren eine Strukturänderung des HN stattfindet, und erst dadurch eine Wechselwirkung mit dem F-Protein eingeht. Diese Wechselwirkung ruft wiederum eine Konformationsänderung des F-Proteins hervor (*Hu et al., 1992; Sergel et al., 1993; Lamb, 1993; Dallochio et al., 1995; Bousse et al., 1994, Deng et al., 1995; Takimoto et al., 2002*). Allerdings kann die Konformationsumwandlung des F-Proteins und somit die Fusion, auch in Abwesenheit von HN ausgelöst werden. Es konnte gezeigt werden, daß isoliertes und in Lipidvesikel eingebautes SeV-F (SeV-F-Virosomen) und SeV-Mutanten, die kein HN besitzen, mit HepG2-Zellen fusionieren können (*Markwell et al., 1985; Bagai et al., 1993; Leyrer et al., 1998*). Es scheint in diesem Falle ein spezifischer Rezeptor der HepG2-Zellen, der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGP-R), der Glykoproteine mit endständiger Galaktose oder N-Acetylgalaktosamine erkennt (*Ashwell und Harford, 1982*), für die Auslösung der Konformationsumwandlung ausreichend zu sein. Man nimmt an, daß das SeV-F an das ASGP-R bindet und nach einer rezeptorvermittelten Strukturumwandlung die Fusion mit der Zellmembran induziert (*Markwell et al., 1985; Bagai et al., 1993; Bitzer et al., 1997; Leyrer et al., 1998*).

Die einzelnen Schritte der Strukturveränderungen des F-Proteins bzw. der F-vermittelten Fusion sind unbekannt. Untersuchungen mittels einer Fluoreszenzmarkierung der N-terminalen Sequenz des SeV-F oder einer Membranmarkierung mit photoaktiven Lipiden ergaben, daß das Fusionspeptid des F-Proteins ebenfalls in die Targetmembran eintaucht (*Rapaport und Shai, 1994; Asano und Asano, 1985; Novick und Hoekstra, 1988*). Das Fusionspeptid kann stabil mit einer Membran wechselwirken und als Anker für andere Membranproteine dienen (*Paterson und Lamb, 1987*).

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß zwei gentechnisch hergestellte „heptad repeat“ Sequenzen, die der HRN und der HRC des SV5-F entsprechen, in Lösung ein stabiles stäbchenförmiges Sechs-Helix-Bündel bilden. Dieses Helix-Bündel besteht aus einem trimeren HRN-"coiled-coil", das von drei HRC-Helices in antiparalleler Richtung umgeben wird (*Joshi et al., 1998; Dutch et al., 1999*). Auch bei zwei weiteren Paramyxoviren, dem Human-Respiratory-Syncytial-Virus (HRSV) und dem NDV, bilden die "heptad repeat"

Sequenzen des F-Proteins ein Sechs-Helix-Bündel (*Zhao et al., 2000; Yu et al., 2002*). Dieser Helix-Komplex ist extrem stabil gegenüber hohen Temperaturen, Detergenzien und Proteasen (*Lamb et al., 1999; Joshi et al., 1998; Zhao et al., 2000*). Die 3D-Struktur des Sechs-Helix-Bündels des SV5-F bzw. des HRSV-F wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt und in Anlehnung an Strukturdaten anderer Fusionsproteine, wie das Influenzavirus-HA und das gp41 des HIV-1, geschlußfolgert, daß dieser Komplex einer Konformation des F-Proteins im fusionsaktiven Zustand entspricht (*Baker et al., 1999; Zhao et al., 2000*). Auch die Tatsache, daß HRC die F-vermittelte Membranfusion vollständig hemmt, unterstützt diese Hypothese (*Rapaport et al., 1995; Lambert et al., 1996; Joshi et al., 1998; Young et al., 1999*). Man nimmt an, daß HRC an HRN bindet und damit die Bildung des Sechs-Helix-Bündels verhindert. Dies wiederum inhibiert die Membranfusion, weil durch die Bildung der antiparallelen "coiled-coil"-Struktur die Lipidbilayer angenähert werden (siehe oben) (*Ben-Efraim et al., 1999; Baker et al., 1999; Zhao et al., 2000; Melikyan et al., 2000*). Weiterführende Untersuchungen der "heptad repeat" Sequenzen deuten darauf hin, daß durch die hohe Affinität der HRN und der HRC zur Membran die Sechs-Helix-Bündel-Struktur sich öffnet und so die Lipidbilayer zusammen bringt (Abb. 1.4.2, a-c) (*Ben-Efraim et al., 1999*). Die folgenden Fusionsschritte entsprechen wahrscheinlich der der HA-vermittelten Fusion.

Für die Paramyxovirus-vermittelte Membranfusion existiert jedoch ein weiteres Modell, welches auf der Annahme basiert, daß Paramyxoviren ein zweites internes Fusionspeptid besitzen (*Peisajovich et al., 2000; Samuel und Shai, 2001; Peisajovich und Shai, 2002*). Synthetisch hergestellte Peptide, die der Aminosäuresequenz von 197 bis 229 des SeV-F entsprechen, sind in der Lage schon bei geringeren Konzentrationen im Vergleich zum N-terminalen Fusionspeptid eine Fusion zwischen Lipidvesikeln zu induzieren (*Peisajovich et al., 2000; Ghosh et al., 2000*). Man postuliert, daß die internen Fusionspeptide mit der Targetmembran interagieren, nachdem die HRN und HRC das Sechs-Helix-Bündel gebildet haben und so die Annäherung der zu fusionierenden Membranen gewährleisten (Abb. 1.4.2).

Für diese Modelle gibt es jedoch keine direkten Hinweise. Die Anordnung der Domänen des F-Proteins, die in der Abbildung 1.4 dargestellt sind, basieren nur auf Vermutungen, weil die dreidimensionale Struktur des Sendaivirus-F noch unbekannt ist. Daher ist die Aufklärung der 3D-Struktur des SeV-F für das Verständnis des Fusionsmechanismus notwendig. Die Kenntnis der F-Protein-Struktur könnte auch Informationen über die fusion-induzierende Wechselwirkung zwischen den F- und HN-

Proteinen liefern. Für diese Zwecke wäre die Kenntnis der 3D-Struktur des F-Proteins des Simianvirus 5 besonders bereichernd. Das SV5 (Stamm W3A) unterscheidet sich von anderen Paramyxoviren dadurch, daß dessen in Zellen exprimiertes F-Protein auch in Abwesenheit des homotypischen HN-Proteins eine Zell-Zell-Fusion induzieren kann (*Paterson et al., 1985; Ito*

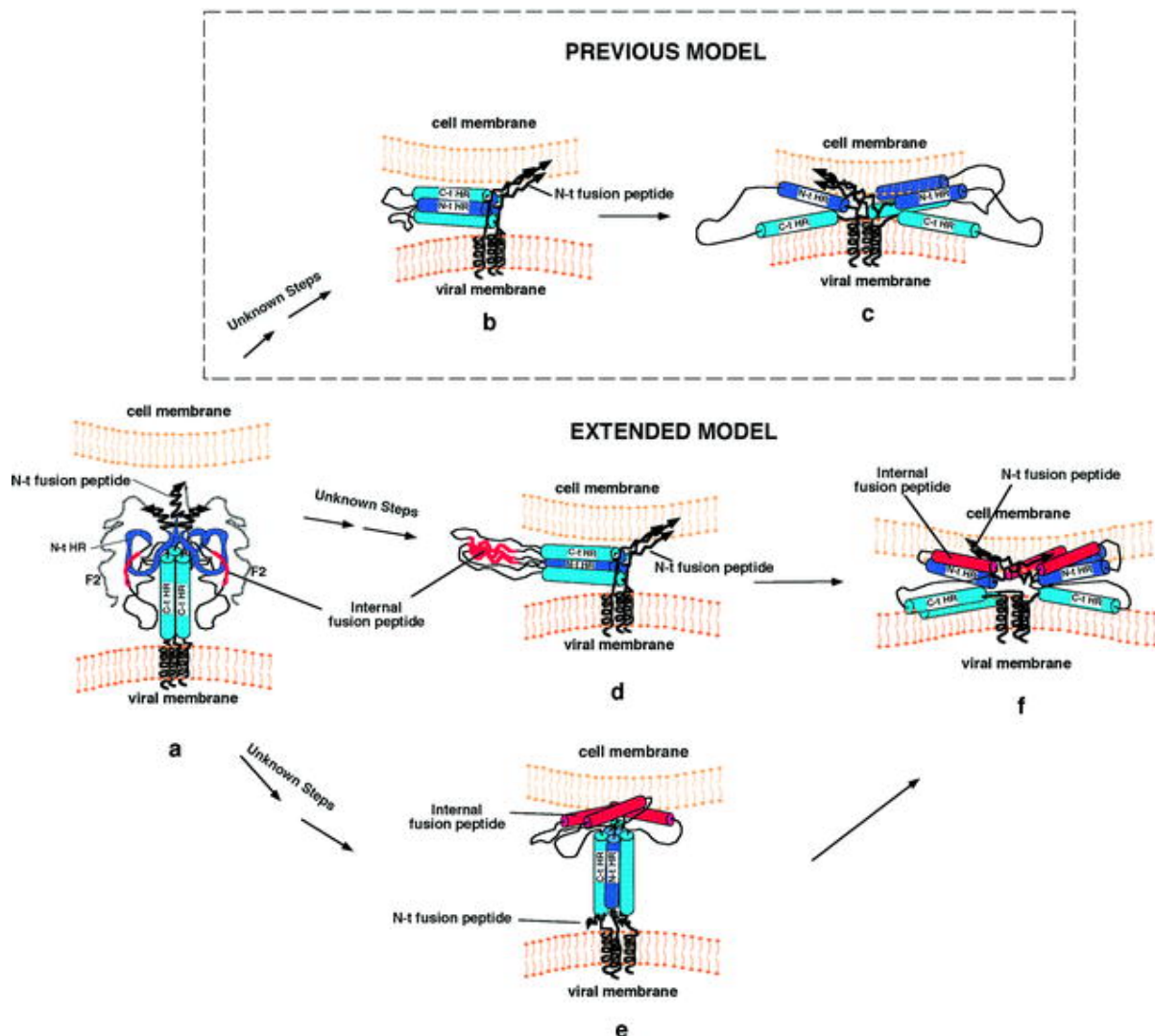


Abb. 1.4.2: Modelle für die SeV-F-vermittelte Membranfusion. (a-c) nach *Ben-Efraim et al., 1999*. Die Wechselwirkung mit der Targetmembran bzw. mit zellulären Rezeptoren induziert eine Strukturänderung des F-Proteins (a). Dabei taucht das N-terminale Fusionspeptid in die Targetmembran ein, und aus HRN und HRC entsteht die antiparallele "coiled-coil"-Struktur (b). Durch die Wechselwirkung mit dem Lipidbilayer öffnet sich die "coiled-coil"-Struktur (c). (a, d-f) basiert auf der Annahme, daß außer dem N-terminalen Fusionspeptid auch ein internes Fusionspeptid existiert. Nach dem Eintauchen des N-terminalen Fusionspeptides in die Targetmembran und der Bildung der "coiled-coil"-Struktur (d) interagiert das interne Fusionspeptid mit der Targetmembran und induziert die Öffnung der "coiled-coil"-Struktur (f). Oder das N-terminale Fusionspeptid taucht in die Virushülle ein, und den ersten Kontakt mit der Targetmembran stellt das interne Fusionspeptid her (e). Die Abbildung wurde aus *Peisajovich et al., 2000* entnommen.

et al., 1997). Diese Eigenschaft des SV5-F könnte sich auch in der 3D-Struktur des Proteins widerspiegeln. Außerdem ist die Röntgenkristallstruktur des Sechs-Helix-Bündels, das durch HRN und HRC des SV5-F gebildet werden, bekannt. Daher könnte man nach der Aufklärung der 3D-Struktur des SV5-F im fusionsaktiven Zustand ermitteln, ob das Helix-Bündel während der Fusion tatsächlich ausgebildet wird und wenn ja, dann im welchem Intermediat der Fusion es entsteht (siehe nachfolgend).

1.5 Inhibierender Einfluß von Lysolipiden auf die Membranfusion

Zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Fusionsproteins in einem Konformationszustand während der Membranfusion ist das "Einfangen" des Fusionsintermediats notwendig. Solche Möglichkeit bietet die Ausnutzung der fusionshemmenden Eigenschaften von Lysolipiden. Lysolipide sind Phospholipide, die nur eine Fettsäurekette besitzen, wodurch sie sich schnell und stabil in Zellmembranen einbauen können (*Fujii et al.*, 1983). Arbeiten an unterschiedlichen Fusionssystemen beschreiben den inhibierenden Einfluß von Lysolipiden auf die Membranfusion (*Yeagle et al.*, 1994; *Chernomordik et al.*, 1993; *Vogel et al.*, 1993). Nicht nur Virus-LUV-Fusion (*Yeagle et al.*, 1994) und Zell-Zell-Fusion (*Chernomordik et al.*, 1993; *Vogel et al.*, 1993), sondern auch Exozytose, Mikrosom-Mikrosom- (*Chernomordik et al.*, 1993) und Granula-Granula-Fusion (*Vogel et al.*, 1993) wurden durch Lysolipide gehemmt. Es wird vermutet, daß ein für alle Fusionssysteme einheitliches Intermediat, nämlich die Bildung von Stalks (siehe oben und Abb. 1.4.1 D), inhibiert wird. Wenn die Lysolipide im äußeren Monolayer der zu fusionierenden Membranen eingebaut sind, wirken sie gegen die negative Krümmung der Stalks, da die Molekülform der Lysolipide (umgekehrter Kegel) eine Struktur mit positiver Krümmung bevorzugt. Dadurch wird die Ausbildung bzw. Vergrößerung der Stalks verhindert (*Chernomordik et al.*, 1987; *Kozlov et al.*, 1989; *Chernomordik et al.*, 1995; *Chernomordik et al.*, 1997; *Chernomordik et al.*, 1999;). Nach den derzeitigen Modellen würde damit ein Fusionsintermediat eingefangen, in dem die Sechs-Helix-Bündel-Struktur bereits gebildet wurde: Erst die Bildung des Helix-Bündels soll die zu fusionierenden

Membran so nah aneinander bringen, daß die Membranverschmelzung stattfinden kann.

Günther-Ausborn und Mitarbeiter erklären den inhibierenden Effekt der Lysolipide auf die HA-vermittelte Membranfusion jedoch mit einem anderen Modell (*Günther-Ausborn et al., 1995*). Sie nehmen an, daß die Lysolipide die Fusion in einem Schritt hemmen, der zeitlich vor der Stalkbildung liegt. Das Modell geht davon aus, daß sich die Lysolipide an das durch die pH-abhängige Konformationsumwandlung zugängliche hydrophobe Fusionspeptid des HA binden, so daß das Eintauchen des Peptides in die Targetmembran und somit die Lipidvermischung behindert wird (*Günther-Ausborn et al., 1995*).

Obwohl die überwiegende Anzahl von Untersuchungen auf diesem Gebiet mit der Stalk-Theorie übereinstimmen, fehlen immer noch endgültige experimentelle Bestätigungen für diese Theorie. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher aufzuklären, ob die Lysolipide die Fusion durch eine Wechselwirkung mit der Membran inhibieren oder durch eine Bindung an das Fusionspeptid.

1.6 Die Rolle der transmembranalen und intraviralen Domäne des Fusionsproteins bei der Membranfusion

Wenn bei der Initiation und den frühen Schritten der Membranfusion die Ektodomäne des Fusionsproteins bzw. das Fusionspeptid eine essentielle Funktion hat, so nimmt man an, daß die transmembranalen und intraviralen Domänen bei den späten Schritten der Membranfusion, wie der Bildung und Weitung der Fusionsporen, eine wichtige Rolle spielen.

Zur Untersuchung der Funktion der transmembranalen (TM) und intraviralen Domäne werden die viralen Fusionsproteine modifiziert und oft in Zellen exprimiert. Daher wird die intravirale Domäne auch zytoplasmatische (CT) Domäne genannt. Eine HA-Mutante, bei der die TM und CT Domänen fehlen und die HA-Ektodomäne an Glycosylphosphatidylinositol (GPI-HA) als Membrananker gebunden ist, kann eine Hemifusion vermitteln (*Kemble et al., 1994; Melikyan et al., 1995; Nüßler et al., 1997; Markosyan et al., 2000*). Dabei verschmelzen die äußeren Monolayer der Membran miteinander und können eventuell kleine Fusionsporen ausgebildet werden. Aber eine ausreichende Öffnung wäßriger Poren, die zur Erweiterung der Fusionsporen führen, wird inhibiert (*Nüßler et al., 1997; Markosyan et al.,*

2000). Um die Öffnung und Weitung der Fusionsporen vermitteln zu können, ist vermutlich eine bestimmte Länge der TM Domäne des HA notwendig (*Armstrong et al., 2000*). Dies wurde an HA-Mutanten untersucht, bei denen die CT Domäne fehlte und bestimmte Aminosäuren (AS) der TM Domäne entfernt wurden. Die Autoren nehmen an, daß eine TM Domäne aus 17 AS zur Vermittlung einer vollständigen Fusion (d. h. Lipidvermischung und Öffnung wäßriger Fusionsporen) ausreichend ist, und eine TM Domäne mit 15 AS und weniger nur eine Hemifusion vermitteln kann (*Armstrong et al., 2000*). Außerdem kann eine Entfernung der CT Domäne des HA die Fusionsgeschwindigkeit und die Virusinfektivität beeinflussen (*Simpson und Lamb, 1992; Jin et al., 1994*).

Modifikationen der CT Domäne des F-Proteins von Paramyxoviren beeinflussen ebenfalls die finalen Fusionsintermediate (*Bagai und Lamb, 1996; Dutch und Lamb, 2001; Sergel und Morrison, 1995*). Je mehr AS vom C-terminalen Ende des SV5-F entfernt werden, desto mehr wird die Erweiterung der Fusionsporen und die Vermischung der zytoplasmatischen Inhalte gehemmt (*Bagai und Lamb, 1996; Dutch und Lamb, 2001*). Durch eine Verkürzung der CT Domäne des NDV-F-Proteins wird die Synzytiumbildung inhibiert (*Sergel und Morrison, 1995*). Es gibt jedoch kaum Untersuchungen, inwieweit eine Sequenzmodifikation der transmembranalen und zytoplasmatischen Domänen die fusiogene Eigenschaft des F-Proteins der Paramyxoviren beeinflußt. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit die Fusionsaktivität von F-Chimären, deren transmembranale und/oder zytoplasmatische Domäne durch entsprechenden Domänen anderer membranständiger Proteine ersetzt sind, untersucht werden. Diese Studien bieten außerdem Möglichkeiten zusätzliche Informationen zur Wechselwirkung des F-Proteins mit dem HN-Protein und die Funktion des HN-Proteins bei der Fusion zu erhalten.

2 Zielstellung

Um sich zu vermehren, müssen Para- und Orthomyxoviren ihr genetisches Material in Wirtszellen einschleusen. Dies wird durch eine Fusion der Virushülle mit der Plasma- bzw. Endosomenmembran der Wirtszelle gewährleistet, die durch ein virales membranständiges Glykoprotein ausgelöst wird. Bei Influenzaviren, einem Orthomyxovirus, übernimmt das Hämagglutinin (HA) diese Funktion. Durch eine pH-Erniedrigung der Umgebung wird eine Konformationsänderung des HA von einem metastabilen in einen stabilen Zustand ausgelöst. Die dabei freigesetzte freie Energie wird für die Vermischung der Membranen verwendet. Paramyxoviren fusionieren im Gegensatz zu den Orthomyxoviren mit ihren Wirtszellen bei neutralem pH-Wert, wobei diese Fusion durch das Fusionsprotein (F) vermittelt wird. Ähnlich wie bei HA findet dabei eine Strukturänderung des F-Proteins statt, der Trigger für diese Konformationsumwandlung ist jedoch bisher unbekannt. Untersuchungen zeigen, daß das zweite membranständige Glykoprotein der Paramyxoviren Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) bei der Auslösung der Strukturumwandlung des F-Proteins beteiligt ist. Das Fusionsprotein ist jedoch unter bestimmten Bedingungen, wie Anwesenheit von Bindungsagenzien oder spezieller Rezeptoren, in der Lage, auch in Abwesenheit des HN eine Membranverschmelzung zu induzieren. Der Mechanismus der F-vermittelten Fusion ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Zum Verständnis der F-HN-Wechselwirkung und des Fusionsprozesses wird die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des F-Proteins dringend benötigt. Bisher konnte die 3D-Struktur der Ektodomäne eines proteolytisch gespaltenen F-Proteins eines Paramyxovirus, des Newcastle-Disease-Virus, röntgenkristallographisch aufgeklärt werden. Es gibt aber keine eindeutigen Hinweise, welchem Zustand des F-Proteins diese Struktur entspricht.

Die vorliegende Arbeit soll erstmals die 3D-Struktur des Fusionsproteins eines Paramyxovirus im fusionskompetenten Zustand mittels Einzelpartikelanalyse und Kryoelektronenmikroskopie aufklären. Zu diesem Zweck sollen Fusionsproteine des Sendaivirus (SeV) und des Simianvirus 5 (SV5) schonend isoliert (d.h. ohne Verlust der Fusionsaktivität des F-Proteins) und rekonstituiert werden. Das Sendaivirus ist ein typischer Vertreter der Paramyxoviren. Jedoch gibt es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der

Oligomerisationsstruktur des Sendaivirus-F. Frühere Untersuchungen ergaben, daß es ein Tetramer ist. Dies widerspricht jedoch Untersuchungen an anderen Paramyxoviren, wie Simianvirus 5 und Newcastle-Disease-Virus, wo eine trimere Form des F-Proteins gefunden wurde. Um diese Widersprüche zu klären, soll auch die Oligomerisation des SeV-F nach der Isolierung mittels chemischem Crosslinking untersucht werden. Das Simianvirus 5 unterscheidet sich von den anderen Paramyxoviren darin, daß das F-Protein, wenn es in Zellen exprimiert wird, auch in Abwesenheit des homotypischen HN-Proteins eine Zell-Zell-Fusion induzieren kann. Daher könnte der Vergleich der 3D-Strukturen der beiden F-Proteine noch mehr Hinweise zur Wechselwirkung zwischen F- und HN-Proteinen geben.

Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie kann man unter Verwendung der Einzelpartikelanalyse kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen die 3D-Struktur eines Fusionsproteins auch im fusionsaktiven Zustand aufklären. Im Rahmen der Arbeit sollen Möglichkeiten zur Induktion der Konformationsumwandlung des F-Proteins und zum "Einfangen" von Fusionsintermediaten erforscht werden. Die Ergebnisse sollen als Grundlage für zukünftige Studien zur Strukturaufklärung des F-Proteins in unterschiedlichen Zuständen der Konformationsänderung während der Fusion dienen.

Desweiteren soll die Rolle der transmembranalen und der intraviralen Domäne des F-Proteins für die Membranfusion und die Wechselwirkung mit dem HN-Protein untersucht werden. Dazu werden Chimären des Sendaivirus-F, dessen transmembranale und/oder zytoplasmatische Domänen durch entsprechende Domänen des Influenzavirus-HA bzw. des nicht fusiogenen Membranproteins CD4 substituiert sind, in geeignete Zellen zusammen mit dem homotypischen HN-Protein exprimiert. Die F-proteinvermittelte Zell-Zell-Fusion soll fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden, wobei durch Anwendung unterschiedlicher Fluorophoren einzelne Fusionsschritte aufgelöst werden soll.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland). Bromelain und Triton X-100 wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz), Lipofectin® Reaganz und YT-Medium bei Gibco Invitrogen Corporation (Karlsruhe, Deutschland) gekauft.

Als Standardpuffer wurde PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4 mit 156 mM NaCl und 150 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ eingesetzt. PBS⁺ enthielt zusätzlich 2 mM $\text{Mg}^{2+}/$ 2 mM Ca^{2+} . Für Messungen bei Werten unter pH 6 wurde Natriumacetat (NaAc)-puffer (130 mM NaCl, 20 mM NaAc) verwendet. Die Zusammensetzung anderer Puffer, die nur für bestimmte Präparationen verwendet wurden, sind in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

Für die Zellkultur wurde DMEM (Dulbeccos modified Eagle Medium) von Gibco Invitrogen Corporation (Karlsruhe, Deutschland) mit oder ohne Zusatz von unterschiedlichen Mengen an fetalem Rinderserum (FCS; Gibco Invitrogen Corporation) verwendet. Zum Ernten der Zellen wurde Trypsin (50 µg/ml)/EDTA (20 µ/ml)-Lösung (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) benutzt.

Octadecylrhodamin-B-chlorid (R18), Acetomethylester des Calceins (Calcein-AM) und 1,1'-bis(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonsäure (bis-ANS) wurden bei Molecular Probes (Eugene, OR, USA) gekauft. Von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) stammt das Triethylammoniumsalz von N-(Lissamintm rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (N-Rh-PE).

1-[15-(2-ethyl-4,4-dimethyl-3-oxy-2-oxazolidinyl)pentanoyl]lysophosphatidylcholin (SL-LPC; C18) wurde freundlicherweise von Prof. Devaux (Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

3.2 Biologisches Material

Viren

Sendaivirus, Stamm Z

Simianvirus 5, Stamm W3 (Prof. Klenk, Institut für Virologie, Philipp-Universität Marburg)

Influenzavirus, Stamm X-31

Rekombinantes Vakziniavirus vTF7-3 (Prof. M.F.G. Schmidt, Institut Immunologie und Molekulare Biologie, Freie Universität Berlin)

Zellen

Humane Erythrozyten (Deutsches Rotes Kreuz, Berlin, Deutschland)

MDBK, Rinder Nierenzellen (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgien)

HepG2, humane Leberkarzinomzellen (ATCC, Manassas, USA)

CV-1, Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatzen (Prof. Klenk, Institut für Virologie, Philipp-Universität Marburg)

Kompetente Zellen von *E. coli*, Stamm XL1 blue (Prof. M.F.G. Schmidt, Institut für Immunologie und Molekulare Biologie, Freie Universität Berlin)

3.3 Anzucht und Reinigung der Viren

3.3.1 Vermehrung von Sendai- und Influenzaviren

Die Zucht von Sendai- bzw. Influenzaviren erfolgte in befruchteten und 11 Tage bebrüteten Hühnereiern. In die Allantoishöhle der Eier wurden je 100 µl einer eingestellten Virus-Suspension (10^{-2} - 10^{-1} HAU/ml) inokuliert. Die Eier wurden für 2 Tage bei 37°C bebrütet und dann zur Abtötung der Embryonen bei 4°C über Nacht gelagert. Nach Entfernung der Eischale im Bereich der Luftkammer konnte die Allantoisflüssigkeit entnommen werden.

3.3.2 Vermehrung von Simianvirus 5

Simianvirus 5 (SV5) wurde auf MDBK-Zellen gezüchtet. Zunächst mußten die MDBK-Zellen in T175-Zellkulturflaschen (Nunc, Life Technologies, Deutschland) bei 37°C mit 5 % CO₂ bis zur Konfluenz vermehrt werden. Das Wachstumsmedium bestand aus 95 % v/v DMEM und 5 % v/v FCS. Ein Tag vor der Virusinokulation wurden die Zellen auf Gewebekulturpetrischalen (Ø 15 cm, Falcon, Biosciences Labware, Deutschland) umgesetzt. Zur Umsetzung wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellschicht mit Trypsin/EDTA-Lösung gespült. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung und die Flaschen wurden ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden 8 ml Wachstumsmedium zugegeben und die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 1:3 mit dem Wachstumsmedium verdünnt und auf die Petrischalen umgesetzt. Am nächsten Tag war die Zellschicht 90-95 % konfluent. Zur Beimpfung wurde das Wachstumsmedium abgenommen und die Zellschicht einmal mit DMEM gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml virushaltiger DMEM-Suspension (0.1-0.3 pfu/Zelle) bedeckt. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurden 18 ml Erhaltungsmedium (98 % v/v DMEM und 2 % v/v FCS) zugegeben. Die inokulierten Zellen wurden bei 37°C mit 5 % CO₂ inkubiert. Am 3. Tag nach der Inokulation wurde das Erhaltungsmedium abgenommen.

3.3.3 Virusreinigung

Zur Reinigung der angezüchteten Viren wurde zunächst die Allantoisflüssigkeit bzw. das Erhaltungsmedium 30 min bei 1000 xg, 4°C zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Durch eine Ultrazentrifugation bei 100 000 xg (1.5 h, 4°C) wurden die Virionen sedimentiert und anschließend in einem geringen Volumen PBS resuspendiert. Daraufhin wurden die Viren über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (60 %, 40 %, 20 % w/v Saccharose in HNE-Puffer, pH 7.4: 5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) geschichtet und 16 h bei 100 000 xg, 4°C zentrifugiert. Die sichtbare Virusbande wurde abgenommen und im dreifachen Volumen PBS gewaschen (100 000 xg, 1h, 4°C). Zuletzt wurden die Viren in PBS aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Die Proteinkonzentration der gereinigten Viren wurde nach der Methode von *Lowry (1965)* bestimmt. Zur Identifizierung der Viren wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet.

3.4 Isolierung und Identifizierung der viralen Fusionsproteine

3.4.1 Isolierung des Sendaivirus-F-Proteins

Diese Präparation wurde nach der Methode von *Tomasi und Loyter (1981)* mit Veränderungen nach *Bagai et al. (1993)* durchgeführt. Sendaiviren (20 mg Virusprotein) wurden in 4 ml Puffer A (20 mM Tris, pH 8.4, 150 mM NaCl, 3 mM DTT) resuspendiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Dialyse der Suspension für 16 h bei 4°C gegen 2 l Puffer B (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM Ca^{2+} , 2 mM Mg^{2+}), wobei der Dialysepuffer dreimal gewechselt wurde. Es wurde ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 12-14 kDa (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die so behandelten Viren wurden 1 h bei 100 000 xg, 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml Puffer B mit 2 % w/v Triton X-100 resuspendiert und 90 min bei RT geschüttelt. Durch eine Zentrifugation (1 h bei 100 000 xg, 4°C) wurde das Nukleokapsid sowie das reduzierte HN ausgefällt, und im Überstand erhielt man das F-Protein in der Detergenzphase. Durch eine schrittweise Zugabe von Bio-Beads SM2 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zum Überstand konnte das Detergenz entfernt werden. Zuvor wurden die Bio-Beads SM2 nach den Angaben des Herstellers in Methanol und Aqua dest. gewaschen. 145 mg gewaschene Bio-Beads SM2 wurden zur Triton-F-Protein-Suspension zugegeben und 2 h bei RT leicht geschüttelt. Diese Inkubation mußte nach einer erneuten Zugabe von 145 mg Bio-Beads SM2 wiederholt werden. Anschließend wurden 290 mg Bio-Beads SM2 hinzugefügt und 2 h bei 4°C inkubiert. Zum Trennen der Bio-Beads SM2 wurde die Suspension mit Hilfe einer Kanüle aufgesaugt und nochmals zentrifugiert (1 h bei

100 000 xg, 4°C). Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 1 ml Puffer B. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von *Bradford (1976)* bestimmt und betrug 0.5-0.8 mg/ml. Die Phospholipidmenge wurde, wie bei *Böttcher et al. (1961)* beschrieben, bestimmt, nachdem die Lipide nach der Methode von *Bligh and Dyer (1959)* aus den Virosomen extrahiert wurden.

Für die Rekonstitution des isolierten F-Proteins wurden 130 nmol Phosphatidylcholin aus Eigelb (Ei-PC) und 56 nmol Phosphatidylethanolamin-N-(lissamin-rhodamin-B-sulfonyl) (Rh-PE) benutzt. Zunächst wurde das Chloroform, worin die Lipide gelöst waren, unter Stickstoff abgedampft. Zum entstandenen Lipidfilm wurde die detergentzhaltige Proteinsuspension zugegeben und 15 min bei RT leicht geschüttelt. Das Detergenz wurde mittels Bio-Beads SM2 wie oben beschrieben entfernt. Die Entfernung von Triton X-100 wurde mittels Absorptionsmessung überprüft (siehe 3.4.3).

3.4.2 Isolierung der Glykoproteine des Simianvirus 5

Die Isolierung der SV5-Membranproteine basiert auf der Methode von *Prehm et al. (1979)*. Zunächst wurden 8 ml Viren (1 mg Virusprotein/ml) mit 100 µl Protease Inhibitor Cocktail 5 min bei RT inkubiert. Zur Virussuspension wurden dann 8 ml 1 M NaCl-Lösung sowie Triton X-100 (Endkonzentration 2 % w/v) zugegeben und 30 min bei RT geschüttelt. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 100 000 xg, 4°C. Der Überstand wurde 4 h gegen 2 l Puffer I (5 mM NaAc, pH 4.5, 0.1 % w/v Triton X-100) bei 4°C dialysiert. Dabei wurde der Dialysepuffer jede Stunde gewechselt. Das Dialysat wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand auf eine mehrmals mit Puffer I gespülte Fetuin-Agarose-Säule (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) aufgetragen. Die Affinitätssäule wurde wieder mit Puffer I gespült, wobei das HN an die N-Acetylneuraminidasesäure (NANA) des Fetuins gebunden und das F-Protein durchgespült wurde. Das HN wurde mit 150 mM NaCl im Puffer I eluiert. Die benutzte Säule wurde mit Puffer II (5 mM NaAc, 500 mM NaCl, 150 mM Glucuronsäure) regeneriert. Die Affinitätssäulenchromatographie wurde bei 4°C durchgeführt. Danach wurde die Detergenzmenge in den Proteinsuspensionen bestimmt (siehe 3.5.3) und das Detergenz wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben durch eine schrittweise Zugabe von Bio-Beads SM2 entfernt. Es wurden 1 mg Bio-Beads SM2 auf 70 µg

Triton X-100 zugegeben. Die isolierten Proteine wurden mittels Centricon 100 nach der Angabe des Herstellers umgepuffert mit PBS (pH 7.4) und aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von *Bradford (1976)* bestimmt und betrug 0.5-0.8 mg/ml.

3.4.3 Bestimmung der Tritonmenge

In den unterschiedlichen Etappen der Proteinisolierung und –rekonstitution wurde die Menge von Triton X-100 nach der Methode von *Hrafnisdóttir und Menon (2000)* bestimmt. Triton X-100 weist eine intensive Absorption bei einer Wellenlänge von 275 nm auf. Da aber die aromatischen Aminosäuren im Bereich um 200-280 nm absorbieren, müssen Proteine in der zu messenden Suspension entfernt werden. Zu je 150 µl Probe wurden 600 µl Methanol und 300 µl Chloroform zugegeben und intensiv gevortext. Dadurch werden die Proteine ausgefällt und Triton X-100 in Chloroform-Methanol-Gemisch gelöst. Die Proben wurden 5 min bei 13 500 xg zentrifugiert, um die ausgefällten Proteine zu pelletieren. Der Überstand wurde bei 275 nm mit einem UV-1202 Spektrometer (Shimadzu, Japan) vermessen. Die Tritonkonzentration konnte aus Meßwerten von gleich behandelten Standardproben berechnet werden.

3.4.4 SDS-PAGE

Zur Identifizierung der Virusproteine wurde die SDS-PAGE unter Verwendung eines Minigel-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Je 50 µl Proben (1 mg Protein/ml) wurden mit je 12.5 µl Probenpuffer (0.5 M Tris, pH 6.8, 5 % SDS, 25 % Glycerol, 0.05 % Bromphenol blau) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden auch unter reduzierenden Bedingungen behandelt. In diesem Fall enthielt der Probenpuffer 25 % β -Mercaptoethanol, und die Proben wurden 3 min bei 95°C inkubiert. Pro Geltasche eines 10 %igen Polyacrylamidgels wurden jeweils 30 µl der entsprechenden Probenlösung aufgetragen.

Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie- oder Silberfärbung visualisiert. Die

gefärbten Gele wurden mit einem Flachbett digitalisiert und mit Hilfe der Sigma-Scan Image Software ausgewertet.

3.4.5 Chemisches Crosslinking

Zur Untersuchung der Oligomerstruktur wurden isolierte F-Proteine mit dem homobifunktionalen Reagenz Dithiobissuccinimidylpropionat (DSP) kovalent verknüpft. Dazu wurden die Proben mit 0.3 mM DSP, das in Dimethylsulfoxid gelöst war, bei 4°C unterschiedlich lange inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Zugabe von 50 mM Glycin und anschließende Inkubation bei 4°C für 15 min gestoppt. Diese Proben wurden mittels SDS-PAGE mit einem 7.5 %igen Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen quantitativ analysiert.

3.4.6 Hämolysetest

Um zu überprüfen, ob die F-Proteine nach der Isolierung noch fusionsaktiv sind, wurde ein Hämolysetest durchgeführt. Humane Erythrozyten wurden dreimal mit PBS bei 2000 xg gewaschen und in PBS (Hk 2.5 %) resuspendiert. Zunächst wurden 500 µl Erythrozyten mit 50 µg F-Virosomen vermischt. Zu dieser Suspension wurde Weizenkeimagglutinin (WGA, wheat germ agglutinin) mit einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Induktion der F-vermittelten Hämolyse wurde die Virosomen-Erythrozyten-Suspension bei 37°C inkubiert und dabei periodisch geschüttelt. Nach bestimmten Zeiten wurden 50 µl Aliquots aus der Suspension entnommen und zu 1 ml eiskaltem PBS zugegeben, um die Hämolyse zu stoppen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 13 000 xg wurde der Überstand bei 540 nm am UV-1202 Shimadzu-Spektrometer vermessen. Zur Berechnung der Hämolyse wurde die Freisetzung des gesamten Hämoglobins durch Triton-Zugabe erzielt. Dazu wurde der Überstand wieder zum Pellet gegeben, Triton X-100 (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und intensiv gemischt. Danach erfolgte eine nochmalige Zentrifugation und Überstandsvermessung. Zur Kontrolle wurden Erythrozyten mit 25 µg Virosomen ohne WGA-Zugabe oder nur mit WGA inkubiert.

Sendaivirus bzw. SV5 induzierte Hämolyse wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt, nur ohne WGA-Zugabe.

3.4.7 FDQ-Assay mit Sendaivirus-F-Virosomen

Zur Untersuchung der Fusionsaktivität des isolierten Sendaivirus-F-Proteins konnte ebenfalls der Fluoreszenzdequenching (FDQ)-Assay verwendet werden (siehe 3.5). Während der Rekonstitution wurde Rh-PE in die F-Virosomen eingebaut, und als Target wurden HepG2-Zellen verwendet. Als Vergleich diente die Fusion von Sendaiviren mit HepG2-Zellen. Die Viren wurden mit R18 markiert (siehe 3.5.1), da sich Rh-PE sehr schlecht in die Lipidhülle von Sendaiviren einbauen lässt.

3.4.7.1 Kultur der HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden in mit Kollagen A beschichteten T75-Zellkulturflaschen (Nunc, Life Technologies, Deutschland) bei 37 C° mit 5 % CO₂ gezüchtet. Das Kulturmedium bestand aus 90 % v/v DMEM und 10 % v/v hitzeinaktiviertem FCS. Für die spektroskopischen Messungen wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde die Zellschicht einmal mit Trypsin/EDTA-Lösung gespült und ca. 10 min bei 37 C° mit 4 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Danach wurden die Zellen in 8 ml Kulturmedium resuspendiert und 30 min bei 4 C° inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS mit 2 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺ (PBS+) gespült und anschließend in PBS+ (10⁷ Zellen/ml) resuspendiert.

3.4.7.2 Fusionsmessung

Fluoreszenzmarkierte Virosomen oder Sendaiviren (50 µg bzw 40 µg Protein) wurden zu 1 ml HepG2-Zellen zugegeben und 40 min bei 4°C inkubiert. Um die nicht gebundenen Zellen zu trennen, wurde die Virosomen- bzw. Virus-Zell-Suspension zweimal mit PBS+ bei 300 xg gewaschen, und das Pellet in 300 µl PBS+ resuspendiert. 150 µl der Virosomen- bzw. Virus-Zell-Suspension wurden zu 1.85 ml PBS+ (pH 7.4 und 37°C) in einer Quarz-Küvette zugegeben, und die Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt. Um die endozytotische Aufnahme der Virosomen durch die Zellen zu verhindern, enthielt der Puffer in der Küvette

20 mM NaN_3 . Nach 45 min wurden 50 μl der Triton X-100-Stammlösung (20 % v/v) zugegeben, um maximales Fluoreszenzdequenching zu erreichen. Während der Messungen wurde die Temperatur mit Hilfe eines angeschlossenen Thermostaten konstant gehalten. Die Suspension in der Küvette wurde kontinuierlich mit einem teflonbeschichteten Magnetrührer gerührt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (cut-off Filter 570 nm, Zeitauflösung 1 sec) gemessen. Der FDQ-Wert wurde nach Formel 3.1 berechnet.

3.5 Fluoreszenzspektroskopische Messungen an Paramyxoviren

Die Fusionsaktivitäten der Viren wurden mittels eines SLM-AMINCO Serie 2 Fluoreszenzspektrometers (AMINCO-Bowman, Urbana, IL, USA) unter Verwendung des R18-Assays untersucht. Diese von *Hoekstra et al. (1984)* beschriebene Methode nutzt die selbstlöschende Eigenschaft des hydrophoben Membranmarkers Octadecylrhodamin-B-chlorid (R18). Bei hohen Konzentrationen des Markers tritt eine gegenseitige Behinderung der Fluoreszenzemission der benachbarten R18-Moleküle auf (self quenching). Wenn eine markierte Membran mit einer unmarkierten fusioniert, resultiert die Abnahme der Oberflächendichte des Markers in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität (fluoreszenzdequenching). Dies ermöglicht kinetische und quantitative Messungen von Fusionsprozessen (*Hoekstra et al.; 1984*). Für den R18-Assay wurde die Virushülle mit R18 markiert, und als Targetmembran wurden Erythrozyten-Ghosts verwendet.

3.5.1 Markierung von Viren mit R18

Zu 200 μl Sendaivirus bzw. Simianvirus 5 mit einer Virusproteinkonzentration von 1 mg/ml wurden 2 μl der R18-Stammlösung (2 mM R18 in Ethanol) gegeben und sofort gevortext. Anschließend wurde die R18-Virus-Suspension 30 min bei Raumtemperatur (RT)

im Dunkeln inkubiert. Zum Entfernen von nicht eingebauten R18-Molekülen wurde die Suspension 7 min bei 42 000 xg, 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert.

3.5.2 Herstellung von offenen Erythrozyten-Ghosts

Diese Präparation wurde nach der von *Dodge et al. (1963)* beschriebenen Methode durchgeführt. Das Erythrozytenkonzentrat wurde dreimal mit PBS gewaschen (2000 xg, 10 min, 4°C) und in eiskaltem Hämolysepuffer I (5.8 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 20 min bei 4°C wurde die Suspension 20 min bei 20 400 xg, 4°C zentrifugiert, das Sediment in eiskaltem Hämolysepuffer I resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 20 400 xg und 4°C. Die 10 minütige Inkubation und die anschließende Zentrifugation wurden so oft wiederholt, bis die Ghosts kein Hämoglobin mehr enthielten (farblos aussahen). Zum Schluß wurden die Ghosts mit 70 ml kaltem PBS gewaschen (10 min, 20 400 xg, 4°C). Zu den Ghosts wurde 0.02 % NaN₃ zugegeben und diese bis zur weiteren Verwendung, jedoch nicht länger als 2 Wochen, im Kühlschrank aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von *Lowry (1951)* bestimmt und betrug 4-6 mg Protein/ml.

3.5.3 Fusionsassay und Datenanalyse

Für die meisten spektroskopischen Messungen mußten zunächst die markierten Viren an die Targetmembran gebunden werden. Dazu wurden 20 µl Viren zu 50 µl Ghosts zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Für einige Versuche wurden 20 µl der R18-markierten Viren direkt in die Küvette mit einer Suspension von 1.93 ml PBS (37°C, pH 7.4) und 50 µl Ghosts zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurden 70 µl der Virus-Ghost-Suspension zu 1.93 ml PBS, pH 7.4 mit voreingestellter Temperatur in einer Quarz-Küvette gegeben. Bei Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurde bei den pH-Werten von 4.5 bis 6.0 NaAc-Puffer verwendet und bei 37°C gemessen. Vor dem Ende jeder Messung (bei 3500 sec) wurde durch Zugabe von 50 µl einer Triton X-100-Stammlösung (20 % v/v) eine unendliche Verdünnung

der Fluoreszenzprobe R18 und damit deren maximale Fluoreszenzintensität erreicht. Während der Messungen wurde die Temperatur mit Hilfe eines angeschlossenen Thermostaten konstant gehalten. Die Suspension in der Küvette wurde kontinuierlich mit einem teflonbeschichteten Magnetprüher gerührt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte jeweils 1 Stunde bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (cut-off Filter 570 nm, Zeitauflösung 1 sec).

Das Ausmaß des Fluoreszenzdequenchings (FDQ) als Maß für die Fusionsausbeute wurde nach der von *Blumenthal et al. (1987)* beschriebenen Formel berechnet:

$$FDQ = 100\% \frac{F(t) - F(0)}{F(\max) - F(0)} \quad (3.1)$$

wobei $F(0)$ bzw. $F(t)$ die Fluoreszenzintensität der R18-Virus-Ghost-Suspension am Anfang der Messung bzw. nach t sec Messung, $F(\max)$ die Fluoreszenzintensität nach Tritonzugabe darstellt.

3.6 Überprüfung des Lysolipideinflusses auf die Fusion von Myxoviren sowie die Untersuchung der Wechselwirkung von Lysolipiden mit Influenzaviren

3.6.1 Untersuchung der Sendaivirus-Ghost-Fusion in Anwesenheit von Lysolipiden

Für die Untersuchung des Einflusses von Lysolipiden auf die Sendaivirus-Ghost-Fusion wurde R18-Assay verwendet (siehe 3.5), und die Sendaiviren wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben mit R18 markiert. Zunächst wurden entsprechenden Mengen an Lysophosphatidylcholin (LPC) zu 50 µl Ghosts in 1.93 ml PBS, pH 7.4 und 37°C, in einer Quarz-Küvette gegeben und 4 min inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 20 µl R18-markierten Sendaiviren in die Küvette. Die Fusion von Sendaiviren mit Ghosts wurde über

einen Zeitraum von 1 h verfolgt, und am Ende der Messung 50 µl einer 20 %igen Triton-X-100-Lösung zugegeben, um eine unendliche Verdünnung des Fluoreszenzmarkers zu erreichen. Weitere Angaben zur Fusionsmessung und Analyse der Meßdaten sowie zur Geräteeinstellung siehe Abschnitt 3.5.

3.6.2 Fusionsanalyse von Influenzaviren mit Ghosts in Anwesenheit von Lysolipiden

Die Fusion von Influenzaviren mit Ghosts in Anwesenheit von Lysolipiden wurde mittels R18-Assays untersucht (siehe 3.5) Dazu war zunächst die Markierung der Influenzaviren mit R18 und eine anschließende Bindung an Ghosts notwendig. Zu 250 µl Influenzavirus mit einer Virusproteinkonzentration von 1 mg/ml wurden 1.25 µl der R18-Stammlösung (2 mM R18 in Ethanol) gegeben und sofort gevortext. Nach einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden die nicht eingebauten R18-Moleküle durch eine 7 minütige Zentrifugation mit 42 000 xg getrennt, und das Pellet in 250 µl PBS resuspendiert. Zu den 250 µl R18 markierten Viren wurden 500 µl offene Erythrozyten-Ghosts (siehe 3.5.2.) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert.

Für die Messung der Fusion erfolgte eine Zugabe von 30 µl der Virus-Ghost-Suspension zu 1.97 ml NaAc-Puffer, 37°C und pH 7.4, in einer Quarz-Küvette. Sechzig Sekunden nach dem Beginn der Messung wurden entsprechende Mengen an Lysophosphatidylcholin (LPC) oder spinmarkiertes LPC (spinlabeled LPC; SL-LPC) in die Küvette gegeben und 4 min inkubiert. Die Fusion wurde durch eine Erniedrigung des pH-Wertes der Suspension auf 5.0, die durch das Einspritzen von 17-22 µl 0.25 M Zitronensäure erreicht wurde, induziert. Um eine unendliche Verdünnung der Fluoreszenzprobe R18 und damit deren maximale Fluoreszenzintensität (F_{max}) zu erreichen, wurden 50 µl einer 20 %igen Triton-Stammlösung 800 sec nach Beginn der Messung zugegeben.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde mittels eines SLM-AMINCO Serie 2 Fluoreszenzspektrometers (AMINCO-Bowman, Urbana, IL, USA) mit einer Zeitauflösung von 0.5 sec verfolgt. Die Geräteeinstellungen entsprachen den Angaben im Abschnitt 3.5.4. Der FDQ-Wert wurde nach der Formel (3.1) berechnet, wobei $F(0)$ und $F(t)$ die

Fluoreszenzintensität der Virus-Ghost-Suspension vor dem Auslösen der Fusion bzw. danach zum Zeitpunkt t darstellt.

3.6.3 Präparation von Bromelain-behandelten Influenzaviren und Bromelain-gespaltener HA-Ektodomäne

Die Abspaltung der HA-Ektodomäne durch Bromelain wurde nach der Methode von *Brand und Skehel (1972)* mit einigen Änderungen nach *Harter et al. (1989)* durchgeführt. Die gereinigten Influenzaviren wurden in 0.1 M Tris-Puffer (pH 7.2) mit 1 mM EDTA resuspendiert und nach Zugabe von 50 mM β -Mercaptoethanol mit Bromelain (Virusprotein/Enzym 1:1 w/w) inkubiert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurden die behandelten Viren 1 h bei 100 000 xg und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in PBS gewaschen, resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

Um BHA zu isolieren, wurde der Überstand mittels Affinitätsäulenchromatographie nach *Doms et al. (1985)* gereinigt. Der Überstand wurde auf eine Ricinsäule (immobilisiertes Agglutinin RCA120 aus *Ricinus Communis*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) aufgetragen und für 15 min inkubiert. Das gebundene BHA wurde mit Galactose als kompetitiven Zucker von der Säule eluiert. Die Galactose wurde durch eine Dialyse für 14 h gegen PBS entfernt. Dabei wurde der Dialysepuffer einmal gewechselt. Die Reinheit der isolierten BHA wurde mittels einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen überprüft. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von *Lowry (1951)* bestimmt.

3.6.4 Bindung von bis-ANS an BHA und Influenzaviren

Mittels bis-ANS-Assay wurde getestet, ob die isolierten BHA-Moleküle intakt sind, d.h. ob sie im sauren Milieu ihre Konformation ändern. Der Einsatz des Fluoreszenzmarkers bis-ANS (1,1'-bis(anilino)-naphtalen-5,5'-disulfonsäure) ermöglicht Aussagen über die Freilegung hydrophober Bindungsstellen und damit über die Konformationsumwandlung von HA bzw. BHA (*Korte und Herrmann, 1994; Korte et al. 1999*). Die Fluoreszenzintensität der

bis-ANS-Moleküle ist stark von der Umgebung abhängig, wobei die Quantenausbeute in einer polaren Umgebung z.B. Wasser sehr gering ist. Bis-ANS kann nichtkovalent an hydrophobe Bindungsstellen von Lipiden und Proteinen binden. Dies führt zur Abnahme der Polarität der Umgebung und zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Für die Versuche wurde eine 1 mM bis-ANS Stammlösung in Methanol angesetzt. Zu 2 ml NaAc-Puffer, pH 7.4, wurden 1 nmol bis-ANS und nachfolgend BHA (Endkonzentration 5 µg/ml) oder Influenzavirus (HA-Endkonzentration 5 µg/ml; 25 % der viralen Proteine sind HA) zugegeben. Zur Erniedrigung des pH-Wertes auf 5.0, womit die Konformationsänderung von BHA/HA ausgelöst wird, wurden entsprechende Mengen von 0.25 M Zitronensäure in die Küvette eingespritzt. Während der Messungen wurde die Temperatur mit Hilfe eines angeschlossenen Thermostaten bei 37°C konstant gehalten. Die Suspension in der Küvette wurde ständig mit einem teflonbeschichteten Magnetrührer gerührt. Die Änderung der bis-ANS-Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm mit einer Zeitauflösung von 0.5 sec gemessen.

Die relative Fluoreszenzintensität (I_{rel}) wurde nach der Formel (3.2.) berechnet:

$$I_{rel}(t) = \frac{I(t) - I(0)}{I(7.4/\max) - I(0)} \quad (3.2)$$

wobei $I(t)$ die gemessene bis-ANS-Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , $I(0)$ und $I(7.4/\max)$ die Fluoreszenzintensität von bis-ANS in wässriger Lösung bzw. in Anwesenheit von BHA/HA bei pH 7.4 darstellt.

3.6.5 Herstellung von SUVs

Für die Herstellung von SUVs (small unilamellar vesicles) wurden 3 mol Ei-PC in einer Chloroformlösung in ein Glasröhrchen gegeben und das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft. Die Lipide wurden in 500 µl PBS (pH 7.4) resuspendiert und anschließend 10 min mit Hilfe des Branson Sonifiers Model W250 (Carouge-Geneve, Schweiz) im Eisbad mit Ultraschall (Output 2, Duty Cycle 50 %) beschallt.

3.6.6 ESR-Messungen

Für die ESR-Messungen wurde spinmarkiertes Lysophosphatidylcholin (SL-LPC, C18), gelöst in Chloroform, verwendet. Entsprechende Mengen von SL-LPC wurden in ein Reagenzglas gegeben und das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft. Die Lysolipide wurden in 10 µl PBS durch vorsichtiges Vortexen angelöst. Für die Untersuchung der Wechselwirkung von SL-LPC mit BHA wurden 100 µl BHA (1 mg/ml) zu 6.3 nmol SL-LPC in PBS zugegeben, wobei das molare Verhältnis von BHA-Monomeren zu SL-LPC ~1:1.5 entsprach. Für die Messung der SL-LPC-Virus-Wechselwirkung wurden jeweils 100 µl natives oder Bromelain-behandeltes Virus (beide 1 mg Virusprotein/ml) zu 3 nmol SL-LPC in PBS hinzugefügt. Wenn man berücksichtigt, daß bei Influenzaviren 75 % des Gesamtgewichts Proteine ausmachen und den Rest Lipide, entsprechen die Molverhältnisse von endogenen Viruslipiden sowie HA-Monomeren (2.5×10^{12} Virionen/mg Virusprotein, 500 Trimere/Virion (*Korte und Herrmann, 1994; Klenk, 1991*) zu den SL-LPC-Molekülen 10:1 bzw. 1:5. Für die Messungen in Anwesenheit von Liposomen wurden 5.25 µl SUVs zu 3.15 nmol SL-LPC zugegeben (Ei-PC:SL-LPC = 10:1 mol/mol). Zu dieser Suspension wurden dann 50 µl BHA (1 mg/ml; BHA-Monomer:SL-LPC = 1:5 mol/mol) zugegeben. Um den pH-Wert der einzelnen Suspensionen auf 5.0 zu erniedrigen, wurden entsprechende Mengen von 0.25 M Zitronensäure zugegeben. Die ESR-Spektren wurden innerhalb 1 min nach pH-Erniedrigung aufgenommen.

Die ESR-Spektren der Proben wurden mit einem Bruker ECS 106 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C verfolgt und mit einem vom Gerätehersteller bereitgestellten Software analysiert. Für ein Spektrum wurden jeweils 8 Scans akkumuliert. Die Meßparameter waren folgende: Modulationsamplitude 4 G und Scanbreite 100 G.

3.7 Fluoreszenzmikroskopische Studien an exprimiertem Sendaivirus-F-Protein und dessen Chimären

3.7.1 Das pTM1/vTF7-3 Expressionssystem

Zur Expression des Sendaivirus-F und dessen Chimären auf CV1-Zellen wurde das pTM1/vTF7-3 Expressionssystem verwendet. Dieses System besteht aus folgenden Komponenten: dem Expressionsplasmid pTM1, welches das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des T7 ϕ 10-Promotors enthält, sowie dem rekombinanten Vakziniavirus vTF7-3, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Die T7-RNA-Polymerase ist äußerst spezifisch für T7-Promotoren und hat eine hohe Transkriptionsaktivität. Nach Infektion einer Zelle mit dem rekombinanten Virus kommt es zum Erliegen der zellulären Proteinsynthese, und es werden ausschließlich virale Gene und damit auch die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Damit steht eine ausreichende Menge an Polymerase zur effizienten Transkription des durch nachfolgende Transfektion in die Zelle eingebrachten T7-Expressionsplasmids zur Verfügung. Die Vakziniavirusinfektion führt aber zu einem starken zytopathischen Effekt und damit zum Zelltod, daher ist eine dauerhafte Expression nicht möglich.

3.7.1.1 Zu exprimierende Proteine und deren Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden der Wildtyp des Sendaivirus-F (Fwt) (Stamm Z) und dessen Chimären: FFH, FHF, FHH, F4F, F44 exprimiert. Bei den Chimären FFH, FHF und FHH wurde die transmembranale und/oder zytoplasmatische Domäne durch die äquivalenten Domänen des Influenzavirus-A-HA (Subtyp H7) ersetzt. Bei den Chimären F4F und F44 wurde die transmembranale bzw. transmembranale und zytoplasmatische Domäne durch die äquivalenten Domänen des membranständigen Proteins CD4 ersetzt. In der Tabelle 3.1 ist ein Übersicht über die Bezeichnung und Zusammensetzung der verwendeten Proteine gegeben. Die Aminosäuresequenzen der entsprechenden transmembranalen und zytoplasmatischen Domänen wurden in der Abbildung 3.6.1 angegeben.

Tab. 3.1: Zusammensetzung und Bezeichnung der untersuchten Proteine. Fwt (F-Wildtyp) entspricht dem Fusionsprotein eines nativen Sendaivirus (SeV-F). Bei den Chimeren FFH, FHF, FHH, F4F und F44 wurden transmembranale und/oder zytoplasmatische Domänen durch die äquivalenten Domänen des Influenzavirus A Hämagglutinins (HA) oder des membranständigen Proteins CD4 ersetzt.

Bezeichnung	Ektodomäne	Transmembranale Domäne	Zytoplasmatische Domäne
Fwt	SeV-F	SeV-F	SeV-F
FFH	SeV-F	SeV-F	HA
FHF	SeV-F	HA	SeV-F
FHH	SeV-F	HA	HA
F4F	SeV-F	CD4	SeV-F
F44	SeV-F	CD4	CD4

Transmembranale Domäne

SeV-F: TVITIIVVMVVILVVIIIVL (23 AS)

HA: VILWFSFGASCFLLLAIAMGLVFICV (26 AS)

CD4: ALIVLGGVAGLLFIGLGIFFCV (23 AS)

Zytoplasmatische Domäne

SeV-F: YRLRRCLMCNPDERIPRDTOTLEPKIRHMOTNGGFDAMAEKR-COOH (43 AS)

HA: KNGNMRCTICI-COOH (11 AS)

CD4: RCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCQCPHRFQKTCSPI-COOH (38 AS)

Abb. 3.6.1 Aminosäuresequenzen der transmembranalen und zytoplasmatischen Domäne der untersuchten Proteine. Zusammensetzung und Bezeichnung der Proteine wurden in der Tabelle 1 dargestellt.

Die Gene des Fwt oder der jeweiligen F-Chimären wurden in den Expressionsvektor pTM1 einkloniert. Die Konstruktion der Chimären und die Einklonierung der Gene wurden von Dr. E. Ponimaskin und C. Weber vom Institut Immunologie und Molekulare Biologie,

Freie Universität Berlin, durchgeführt. Auch die Etablierung der Proteinexpression und die Überprüfung der Expression mittels Immunfällung und FACScan wurden von ihnen durchgeführt. Die Oberflächenexpression des Fwt und dessen Chimären waren vergleichbar (*Ponimaskin und Schmidt, 1998; Weber, Ponimaskin und Schmidt, persönliche Mitteilung*).

In jedem Expressionsansatz von den Fwt bzw. F-Chimären wurde zusätzlich der Wildtyp des Sendaivirus-HN-Proteins (Stamm Z) co-exprimiert. Die cDNA des HN wurde freundlichst von Dr. A. Portner, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, zur Verfügung gestellt. Die HN-cDNA war ebenfalls in den Expressionsplasmid pTM1 einkloniert.

3.7.1.2 Transformation der Bakterienzellen

Die verwendeten Plasmide wurden in Bakterienzellen gezüchtet. Dazu mußten zunächst die Bakterienzellen mit den entsprechenden DNA transformiert werden. Für jede Plasmidprobe wurden 300 µl der kompetenten *E. coli*-Suspension vorbereitet. Je 10 ng Plasmidprobe wurden mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt und zur Bakteriensuspension hinzugefügt. Das DNA-Bakterien-Gemisch wurde 40 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 45 sec ausgesetzt. Die transformierten Zellen wurden mit je 600 µl YT-Medium (ohne Ampicillinzugabe) versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Um die tatsächlich transformierten Bakterien von den nicht transformierten zu trennen, wurden sie auf Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Da die verwendeten Plasmide das Resistenz-Gen gegen Ampicillin enthalten, überleben auf diesen Platten nur die transformierten Bakterien. Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden je vier einzelne, scharf abgegrenzte Bakterienkolonien pro Platte ausgewählt. Diese wurden nun in 3 ml YT-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/l) weiter gezüchtet (ca. 18 h bei 37°C). Nach einer DNA-Mini-Präparation mit Hilfe eines QIAGEN Plasmid Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurden die isolierten F-Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese identifiziert.

3.7.1.3 Anlegen einer Glycerolkultur

Aus den transformierten Bakterien, die bei der elektrophoretischen Analyse eine zufriedenstellende DNA-Identifikation ergaben, wurden zur Aufbewahrung über längere

Zeiträume Glycerolkulturen angelegt. In glycerolhaltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen sehr lange lagern, ohne daß ihre Vitalität verlorengeht. Je 700 µl der Bakterienkultur aus der Anzucht für die Mini-Präparation wurden mit je 500 µl sterilem Glycerol gemischt und bei –80°C aufbewahrt.

3.7.1.4 Plasmidzucht und –reinigung

Zum Erhalt einer größeren Menge an DNA wurden 100 µl der Glycerolkultur (auf Eis aufgetaut) zu 100 ml YT-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/l) zugegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mittels QIAfilter Plasmid Maxi Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers. Die Menge der gereinigten DNA wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie bei 260 nm bestimmt.

3.7.1.5 Transfektion von CV1-Zellen

CV1-Zellen wurden in DMEM mit einem Zusatz von 5 % v/v FCS bei 37°C mit 5 % CO₂ gezüchtet. Zirka 80 % konfluente Zellmonolayer in Ø 3.5 cm Petrischalen (Nunc, Life Technologies, Deutschland) wurden zweimal mit DMEM gewaschen, mit rekombinanten Vakziniaviren vTF7-3 (10 PFU/Zelle) infiziert und 1 h bei 37°C mit 5 % CO₂ inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Plasmide für die Transfektion vorbereitet. Je Transfektionsansatz wurden, falls nicht anders angegeben, 3 µg cDNA des Fwt bzw. einer F-Chimäre und 6 µg cDNA des HN auf 100 µl mit DMEM verdünnt, sowie 10 µl Lipofectin mit 90 µl DMEM vermischt. Beide Suspensionen wurden 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden diese Suspensionen vereinigt, vorsichtig vermischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Von den zu transfizierenden Zellen wurde das Virusinokulum entfernt, und die Zellmonolayer einmal mit DMEM gewaschen. Die Transfektionslösungen wurden auf 1 ml mit DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 32°C mit 5 % CO₂ inkubiert.

3.7.2 Untersuchung der Zell-Zell-Fusion

3.7.2.1 Markierung von Erythrozyten mit R18 und Calcein-AM

Bei dieser Präparation wird die Plasmamembran der Erythrozyten (RBC: red blood cells) mit hydrophobem R18 und das Zytosol mit hydrophilem Calcein-AM markiert. Zuerst wurde das humane Erythrozytenkonzentrat dreimal mit PBS gewaschen (10 min, 2000 xg, 4°C) und auf Hk 2 verdünnt. Zu 5 ml dieser Suspension wurden 20 µl R18 (2 mM in Ethanol) unter Vortexen zugegeben und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Um nicht eingebautes R18 zu absorbieren, wurde 25 ml DMEM mit 5 % v/v FCS zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde 10 min bei 4°C, 2000 xg zentrifugiert, und der Überstand entfernt. Die RBC wurden einmal mit PBS gewaschen und in 2 ml PBS aufgenommen. Dazu wurden 50 µl Calcein-AM (1 mM in DMSO) zugegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Das Calcein-AM diffundiert durch die Membran ins Zytosol und wird dort von zelleigenen Esterasen zu Calcein gespalten, welches fluoresziert und nicht mehr durch die Plasmamembran diffundieren kann. Die Erythrozyten wurden 2 mal mit PBS gewaschen (10 min, 2000 xg, 4°C) und wieder bei 37°C, 20 min inkubiert. Es erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS. Zuletzt wurden sie mit PBS+ gewaschen und in 5 ml PBS+ resuspendiert. Die markierten RBC konnten bei 4°C bis zu 3 Tage gelagert werden.

3.7.2.2 Doppelmarkierung der HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden wie die Erythrozyten mit R18 und Calcein markiert. Dazu wurden 3 ml einer HepG2-Zellsuspension (10^7 Zellen/ml, Vorbereitung der Zellsuspension siehe 3.5.7.1) verwendet. 20 µl R18 (2 mM in Ethanol) wurden zu den Zellen unter vorsichtigem Schütteln zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurden 10 ml eiskaltes DMEM mit 5 % FCS zugegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS+ gewaschen (5 min bei 4°C, 380 xg) und mit 30 µl Calcein-AM (1 mM in DMSO) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurden die Zellen dreimal 5 min bei 380 xg und 4°C mit PBS+ gewaschen und noch einmal bei 37°C, diesmal aber für 20 min inkubiert. Zum Schluß wurden Zellen wieder dreimal mit PBS+ gewaschen. Die Zellen wurden in 3 ml PBS+ resuspendiert und am gleichen Tag verwendet.

3.7.2.3 Vorbereitung der Expressionszellen und Bindung der Targetzellen

Die transfizierten CV1-Zellen (siehe 3.7.4) müssen zunächst einer Neuraminidase- und Trypsinbehandlung unterzogen werden. Durch die Neuraminidase werden die zelleigenen Sialinsäurereste verdaut, um eine Wechselwirkung der exprimierten HN-Moleküle mit diesen Rezeptoren zu unterbinden und eine bessere Bindung der Targetzellen an die Expressionszellen zu gewährleisten. Das Trypsin spaltet die exprimierten F-Moleküle in die fusionsaktive Form F1+F2. Dazu wurden die Zellmonolayer vom Nährmedium befreit und zweimal mit PBS+ gespült. Auf die Petrischalen wurden je 1 ml PBS+ mit 1 U Neuraminidase und 10 µg Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde der Puffer verworfen, und die Zellen wurden dreimal mit frischem PBS+ gespült.

Die Bindung der Targetzellen an die Expressionszellen erfolgte im Dunkeln und unter gelegentlichem Schwenken der Petrischalen. Es wurden je 1 ml der markierten Erythrozyten (oder 500 µl HepG2-Zellen) zugegeben und 60 min auf Eis inkubiert. Die nicht gebundenen Targetzellen wurden durch mehrmaliges Waschen mit gekühltem PBS+ entfernt. Zum Schluß wurde 1 ml PBS+ auf den Zell-Erythrozyt-Komplex gegeben, und die Zellen wurden auf Eis aufbewahrt.

3.7.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst wurde eine Aufnahme von den jeweiligen Zell-Zell-Komplexen vor dem Fusionsvorgang gemacht, um die Bindung der markierten Zellen zu überprüfen und ein Vergleichsbild für den Fusionsprozeß zu haben. Die Zell-Zell-Fusion wurde durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 37°C induziert. Nach 15 min Inkubation im Brutschrank (37°C) wurden die Zellen wieder mikroskopisch untersucht. Dabei wurde der Übergang der einzelnen Fluorophore kontrolliert. Der Fusionsprozeß wurde nach weiteren Inkubationen bei 37°C im Abstand von 15 min beobachtet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Studien wurden bei RT mit einem Mikroskop Axiovert 100 (Carl Zeiss, Deutschland) unter Verwendung eines 40 x Objektivs (LD Achromplan) durchgeführt. Die eingesetzten Fluorophore wurden mit folgenden Einstellungen betrachtet: Rhodamin – 510-560 nm BP-Anregungsfilter/ 590 nm LP-Emissionsfilter, Calcein – 450-490 nm Anregungsfilter/ 520 nm LP-Emissionsfilter. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der MC 80 Mikroskopkamera auf Kodak Ektachrome P 3200 ASA Farbfilm.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung des Sendaivirus-F-Proteins und Aufklärung seiner 3D-Struktur

4.1.1 Isolierung und Charakterisierung des SeV-F-Proteins

Die Isolierung des SeV-F erfolgte nach der Methode von *Tomasi und Loyter (1981)* mit Veränderungen nach *Bagai et al. (1993)*. Das F-Protein wurde aus der Detergenz-Extraktion von Sendaiviren aufgereinigt. Die Detergenz-Extraktion von nativen Sendaiviren enthält gewöhnlich die beiden membranständigen Glykoproteine HN und F, aber nach der Behandlung der Viren mit DTT und einer anschließenden mehrstündigen Dialyse ist HN nicht mehr in Detergenzien solubilisierbar. Somit kann man nach einer Solubilisierung der Virushülle mit Detergenz das Nukleokapsid, das M- und das HN-Protein abzentrifugieren und das F-Protein in der Detergenzphase erhalten. In der Abbildung 4.1.1 ist das SDS-PAGE-Bild von Sendaivirus (Bahn SeV) und der in Detergenz solubilisierten Virushüllproteine (Bahn Env) nach einer Coomassieblau-Färbung gezeigt. Nach der Behandlung der Viren mit DTT enthält die Detergenzphase nur das F-Protein (Abb. 4.1.1 A und B, Bahn F). Unter nicht reduzierenden Bedingungen existieren zwei F-Protein-Banden (Abb. 4.1.1 A). Die intensive Bande bei ca. 60 kDa entspricht dem F-Protein, das aus den durch eine Disulfidbrücke verbundene Untereinheiten F1 und F2 besteht. Es ist die fusionskompetente Form des SeV-F, die durch das Spalten des Vorläuferproteins F0 entsteht. Die schwächere Bande bei ca. 48 kDa entspricht der Untereinheit F1. Unter reduzierenden Bedingungen wird die Disulfidbrücke zwischen F1 und F2 gespalten, und auf dem Gel erscheint nur die F1-Bande (Abb. 4.1.1 B). Die F2-Bande, die ca. 10 kDa groß ist, ist durch eine Coomassieblau-Färbung nicht detektierbar, wie schon bereits in früheren Arbeiten berichtet wurde (*Hsu et al. 1979*;

Nakanishi et al. 1982; Bagai et al. 1993). Die Elektrophorese-Bilder zeigen auch, daß in den Proteinpräparationen kein ungespaltenes Vorläuferprotein F0 (ca. 62 kDa) vorhanden war.

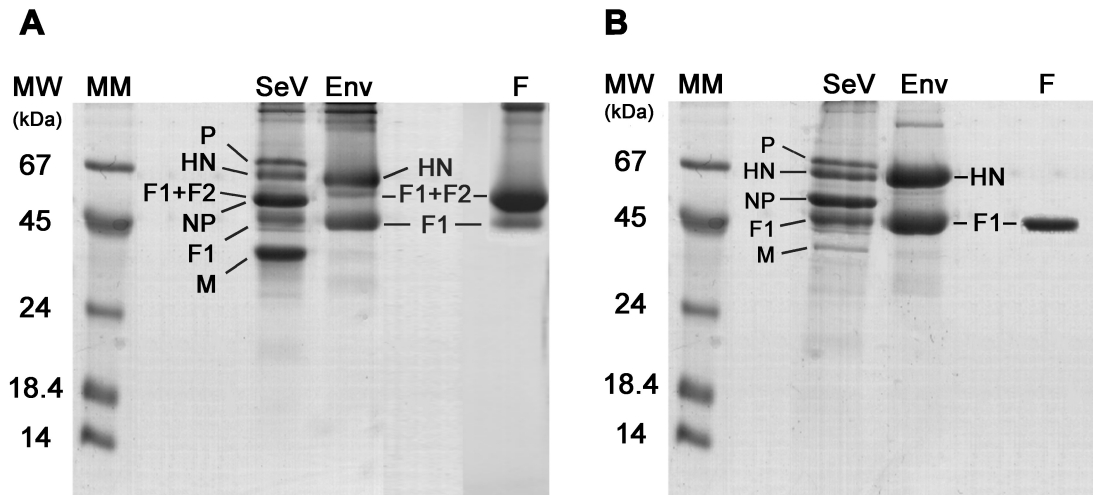


Abb. 4.1.1 SDS-PAGE-Bilder des Sendaivirus (SeV) und der Triton-Extraktion der Virushülle ohne (Env) bzw. mit Vorbehandlung der Viren mit DTT (F) unter nicht reduzierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen (siehe "Material und Methoden" und Text). Die 1. Bahn der Gele sind Markerproteine (MM) mit bekanntem Molekulargewicht (MW). Die Proteinbanden wurden anhand des Molekulargewichts identifiziert und mit den jeweiligen Proteinennamen gekennzeichnet. Das 10%ige Acrylamid-Gel wurde mittels Coomassieblau gefärbt.

Zusätzlich wurde die Oligomerisierung des isolierten SeV-F untersucht. Dazu wurden die rekonstituierten F-Virosomen (mehr dazu siehe Abschnitt 4.1.3) mit dem bifunktionalen Crosslinker Dithiobis-(succinimidylpropionate) (DSP) unterschiedlich lange bei 4°C inkubiert und mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen (1 % SDS) analysiert. Die visualisierten Banden wurden anhand der Markerproteinbanden berechnet. Wie in der Abbildung 4.2.2 A dargestellt, wurden Banden bei ca. 48, 60, 120 und 160 kDa detektiert. Eine Berechnung des Molekulargewichts des (F1+F2)-Monomers, -Dimers und -Trimers, basierend auf der F-Proteinsequenz, ergab 58.9 kDa, 117.8 kDa bzw. 177.7 kDa, und 49 kDa für das F1-Monomer. Daher entsprechen die Banden im Gel dem (F1+F2)- Monomer, -Dimer bzw. -Trimer sowie dem F1-Monomer. Nach 5 min Inkubation mit DSP verschwindet die F1-Bande (Bahn 5') und die (F1+F2)-Monomer-Bande wird schwächer bzw. verschwindet vollständig nach einer DSP-Inkubation für 30 min (Bahn 30'). Mit der Abschwächung der Monomer-Bande wird die Trimer-Bande intensiver. Die Dimer-Bande hat in allen Bahnen

eine schwächere Intensität im Vergleich zu den anderen F1+F2-Banden. Entscheidend für unsere Ergebnisse war, daß keine Tetramer-Komplexe beobachtet wurden. Die größeren Oligomere, die durch den Crosslinker entstanden sind, liegen in höheren Bereichen. Manche dieser Oligomere konnten nicht in das Gel eindringen. Die höheren F-Banden waren unter nicht reduzierenden Bedingungen auch ohne Zugabe von DSP detektierbar. Anscheinend reicht eine SDS-Konzentration von 1 % nicht aus, um die nichtkovalente Oligomerisation von F1+F2-Proteinen zu unterbrechen. Um dies zu überprüfen, wurde die Proteinsuspension mit unterschiedlichen SDS-Mengen versetzt (Abb. 4.1.2 B). Bei höheren SDS-Konzentrationen waren alle Banden oberhalb der 67 kDa-Marke nur schwach bzw. nicht mehr detektierbar, und die (F1+F2)-Monomer-Bande wurde intensiver.

Diese Untersuchungen zeigen, daß das SeV-F aus nativen Viren aufgereinigt werden konnte und in der Virushülle als Trimer organisiert ist.

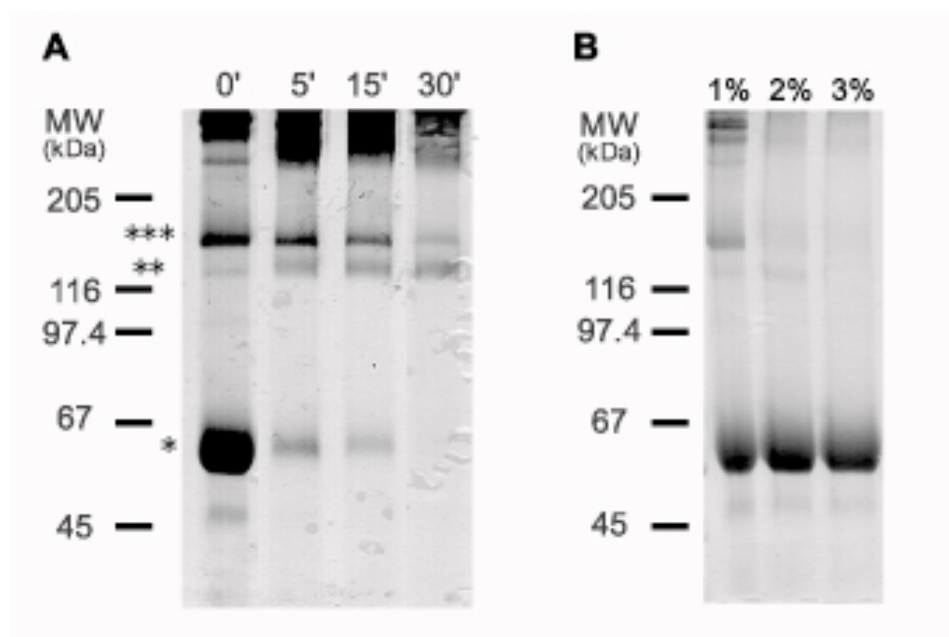


Abb. 4.1.2 Analyse des isolierten F-Proteins mittels 7.5 %igen Acrylamidgels unter nicht reduzierenden Bedingungen. (A) Zur Untersuchung der Oligomerisation wurde das SeV-F unterschiedlich lange mit 0.3 mM bifunktionalen Crosslinker DSP bei 4°C inkubiert. Die Monomer-, Dimer- und Trimer-Banden des F sind jeweils mit (*), (**) bzw. (***) gekennzeichnet. Die Endkonzentration von SDS in den Proben betrug 1 %. (B) Die F-Proteinbanden nach Zugabe von unterschiedlichen SDS-Mengen. Die Gele wurden mit Coomassieblau gefärbt. An der linken Seite der Gele sind die Molekulargewichtsmarker dargestellt.

4.1.2 Überprüfung der Fusionsaktivität des isolierten SeV-F-Proteins

Nach der Isolierung des SeV und einer Rekonstitution in Liposomen wurde die Fusions- und Hämolyseaktivität des SeV-F untersucht, um zu überprüfen, ob die Funktion des Proteins erhalten blieb. Normalerweise ist die Anwesenheit des HN-Proteins zur Induktion der F-proteinvermittelten Fusion notwendig. Es ist jedoch bekannt, daß das SeV-F eine Fusion mit HepG2-Zellen auch in Abwesenheit von HN vermitteln kann (*Markwell et al., 1985; Bagai et al., 1993*). Daher wurden zur Untersuchung der Fusionsaktivität des isolierten F-Proteins HepG2-Zellen als Target verwendet. Die Virosomen-Zell-Fusion wurde mittels Fluoreszenzdequenching-(FDQ)-Assays gemessen (siehe "Material und Methoden"). Nach der Bindung von F-Virosomen, die mit Rh-PE in selbstlöschender Konzentration markiert waren, an unmarkierte HepG2-Zellen bei 4°C wurde die Fusion durch eine Inkubation bei 37°C ausgelöst. Wie in der Abbildung 4.1.3 (SeV-F) dargestellt, wurde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet.

Dies beruht auf der Aufhebung des Selbstquenchings der Markermoleküle aufgrund der Verdünnung der Markerkonzentration, die durch die Verschmelzung der markierten mit der nichtmarkierten Membran verursacht wird. Die Fusionsaktivität des Sendaivirus-F-Proteins wird bei einer Vorinkubation der Viren ohne Targetmembran über 55°C inaktiviert (*Wharton et al., 2000; Ohlwein, Baljinnyam und Herrmann, unveröffentlichte Resultate*). Es wurde keine Änderung der Fluoreszenzintensität nach einer Vorinkubation der F-Virosomen ohne Target für 20 min bei 56°C beobachtet, deshalb beruht das beobachtete Fluoreszenzdequenching nicht auf einem unspezifischen Markerübergang (Abb. 4.1.3 SeV-F, Kontrolle). Daher ist die beobachtete Erhöhung der Fluoreszenzintensität ein direktes Maß für die Fusion. Die Fusionsaktivität des isolierten F-Proteins ist vergleichbar mit der von nativen Viren. Der Anstieg der Meßkurve der SeV-Zell-Fusion ist steiler, und das Fusionsausmaß ist etwas höher als der von SeV-F-Virosomen (Abb. 4.1.3, SeV). Dies ist jedoch durch die Anwesenheit von HN erklärbar. Frühere Untersuchungen zeigten, daß die Fusion von Sendaivirosomen mit HepG2-Zellen in Anwesenheit von HN schneller verlaufen als in Abwesenheit von HN (*Bagai et al., 1993*).

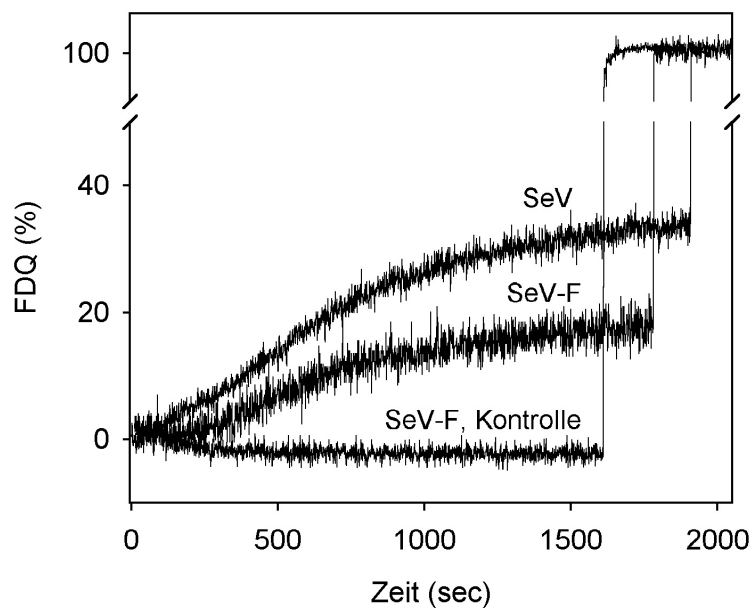


Abb. 4.1.3 Fusion der rekonstituierten SeV-F-Virosomen (SeV-F) oder des Sendaivirus (SeV) mit HepG2-Zellen bei 37°C und pH 7.4. Rh-PE markierte Virosomen oder R18 markierte Viren wurden an HepG2-Zellen bei 4°C für 30 min gebunden. Die Fusion wurde durch Überführung der jeweiligen Suspension in vorgewärmten PBS+ (37°C) induziert. Es wurde keine Fusion beobachtet, wenn Viren (Daten nicht gezeigt) oder Virosomen (SeV-F, Kontrolle) 20 min bei 56°C vorinkubiert wurden. Die Fluoreszenzintensität der Marker in Anwesenheit von 0.5 % Triton wurde als 100 % Dequenching gesetzt. Für weitere Details und zur Berechnung der FDQ siehe „Material und Methoden“.

Die SeV-F-Virosomen wiesen auch Hämolyseaktivität auf, wenn Weizenkeimagglutinin (WGA; wheat germ agglutinin) als Bindungsagens vorhanden war (Abb. 4.1.4). WGA ersetzt in diesem Fall die Funktion des fehlenden HN. In Abwesenheit von WGA wurde keine Hämolyse induziert (Daten wurden nicht gezeigt). Die Hämolyseaktivität von F-Virosomen war im Vergleich zu nativen Viren niedriger, was wahrscheinlich auf die Abwesenheit von HN zurückzuführen ist. Unsere Daten stimmen mit früheren Untersuchungen überein (*Tomasi und Loyter, 1981; Bagai et al. 1993*). Um zu überprüfen, ob WGA Hämolyse induziert, wurden Erythrozyten mit nur WGA oder mit hitzeinaktivierten F-Virosomen inkubiert. In beiden Fällen wurde keine Hämolyse festgestellt (Daten nicht gezeigt).

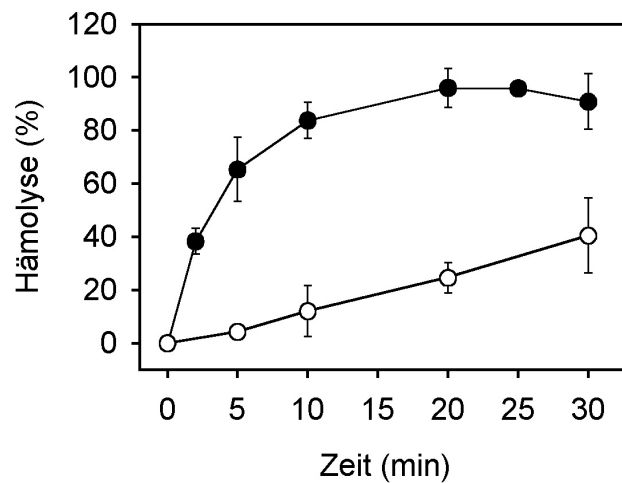


Abb. 4.1.4 Hämolysenaktivität von Sendaiviren (●) und SeV-F-Virosomen (○). Die Viren bzw. Virosomen wurden an Erythrozyten bei 4°C gebunden und unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert (siehe „Material und Methoden“). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

4.1.3 Optimierung der SeV-F-Virosomen für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur

Da das Ziel der Isolierung des Fusionsproteins die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mittels Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse war, mußte überprüft werden, ob die Präparate dazu geeignet waren. Die SeV-F-Virosomen, die ohne Zugabe von Lipiden hergestellt wurden, enthielten noch virale Lipide. Basierend auf der ermittelten Protein- und Phospholipidmenge wurde das molare Verhältnis vom F-Protein zu Phospholipiden berechnet, und es betrug 1:100. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Virosomen zeigten fadenförmige Strukturen (Filamente), an denen die F-Proteine perlenkettenartig angeordnet waren. Die Proteinspikes ragten aus dem Lipidbilayer heraus und hatten einen globulären Kopf mit einem dünnen Stiel. Die F-Proteine wiesen starke Wechselwirkungen in der Kopfregion auf, so daß sie an beiden Längsseiten der Filamente eng aneinander aufgereiht waren. An den Enden der Filamente, wo die Membrankrümmung

besonders stark ist, befanden sich keine Proteine. Außerdem nahmen die Proteine nur einige wenige Orientierungen im Raum ein.

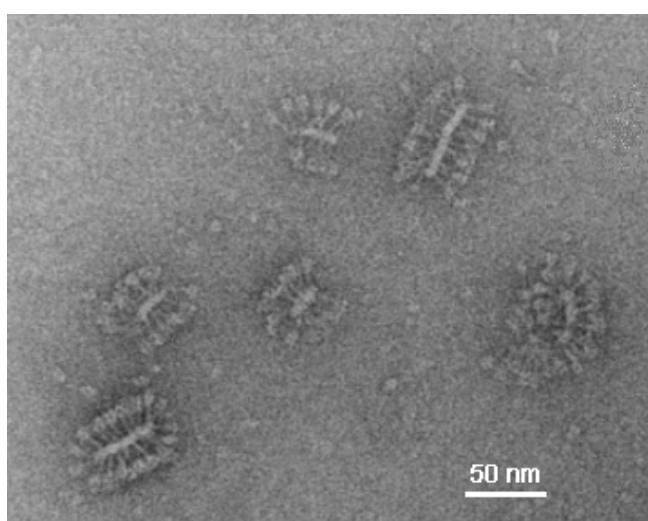
Zur Strukturaufklärung mit der Einzelpartikelmethode sind jedoch Aufnahmen von einzelnen, sich nicht überlappenden Molekülen, die sich in möglichst vielen unterschiedlichen Raumwinkeln befinden, notwendig. Bei der Bildverarbeitung werden Bilder von einzelnen Molekülen in starker Vergrößerung selektiert und mit einer Kreismaske (dadurch wird der Hintergrund, der keine Bildinformation enthält, entfernt) versehen. Die Informationen innerhalb der Kreismaske bilden den Datensatz eines Moleküls. Falls sich in dieser Maske Fragmente eines benachbarten Moleküls befinden würden, würde dies die Information zum selektierten Molekül verfälschen. Eine zu kleine Maske kann jedoch zum Informationsverlust führen. Außerdem ist eine zufällige Verteilung der Moleküle in unterschiedlichen Raumwinkeln erforderlich, um Informationen über die räumliche Struktur des Proteins zu erhalten und sie mit isotroper Auflösung zu berechnen. (Eine ausführliche Erklärung der Grundlagen der Einzelpartikelmethode und Beschreibung der einzelnen Schritte zur Rekonstruktion der 3D-Struktur eines Proteins am Beispiel von Influenzavirus HA ist in der Promotionsschrift von *K. Ludwig, 2000*, nachzulesen).

Die Inkorporation der Proteine in die Membran von sehr kleinen Lipidvesikeln würde eine Lösung des Problems bieten. Aufgrund der starken Membrankrümmung könnte der Abstand zwischen der Kopfregion der Proteine mit der Entfernung vom Membran vergrößert werden. Als ideal erwiesen sich bei der Strukturaufklärung von Influenza HA rosettenförmige Assoziate (Rosetten) von 3 bis 10 HA-Trimeren. Da sich die Methoden der Proteinisolierung stark unterscheiden, kann man jedoch nicht auf die Erfahrungen aus der HA-Präparation zurückgreifen. Daher wurde versucht, die Form der SeV-F-Virosomen durch externe Lipide zu beeinflussen. Zunächst wurden unterschiedliche Mengen von Phosphatidylcholin aus dem Eigelb (Ei-PC) oder ein Gemisch von Ei-PC und einem anderen Lipid zur detergentzhaltigen Protein-Suspension zugegeben. Nach der Entfernung des Detergenz und Aufkonzentrierung wurden die SeV-F-Virosomen mittels Elektronenmikroskopie beobachtet. In der Tabelle 4.1 sind die am häufigsten aufgetretenen Formen der Virosomen abhängig vom Lipidzusatz zusammengefaßt.

Tab. 4.1 Beeinflussung der Virosomenform durch Zusatz von Lipiden

Lipidzusatz zur Herstellung von SeV-F-Virosomen	131 μM Ei-PC	262 μM Ei-PC	65.5 μM Ei-PC/ 238 μM Cholesterol	131 μM Ei-PC/ 111.2 μM Rh-PE	131 μM Ei-PC/ 55.6 μM Rh-PE
Virosomenform	Filamente und Vesikel, \varnothing 200 nm	große Vesikel, \varnothing 300 nm, und Filamente	Filamente, 200-500 nm lang	Filamente, ca. 200 nm lang	kurze Filamente, z.T. Rosetten und einzelne Proteine

Der Abstand zwischen den F-Proteinen wurde durch Zugabe von 131 μ M Ei-PC etwas vergrößert, aber die entstandenen Vesikel waren zu groß. Eine Erhöhung der Ei-PC-Menge oder Zusatz von Cholesterol brachte keine befriedigende Änderung. Nur bei Zugabe von 131 μ M Ei-PC und 55.6 μ M Rh-PE wurden kurze Filamente, z.T. auch Rosetten gebildet. In der Abbildung 4.1.5 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von F-Virosomen mit obengenannter Lipidzugabe dargestellt. Die Proteine hatten in der Kopffregion nicht nur genügend Abstand, sondern waren auch in unterschiedlichen Raumwinkeln vorhanden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden F-Virosomen mit Zugabe von 131 μ M Ei-PC und 55.6 μ M Rh-PE zur Aufklärung der 3D-Struktur des SeV-F-Proteins verwendet.

**Abb. 4.1.5** Elektronenmikroskopische Aufnahme des isolierten SeV-F nach der Rekonstitution mit 131 μ M Ei-PC/55.6 μ M Rh-PE. Der Balken entspricht 50 nm.

4.1.4 Aufklärung der 3D-Struktur des SeV-F-Proteins

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die 3D-Strukturaufklärung wurden von Christoph Böttcher und Kai Ludwig (beide Freie Universität Berlin) durchgeführt.

Für die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Proben mit einem Schwermetall kontrastiert und dann in amorphes Eis eingebettet. Die Negative der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden digitalisiert und die Bilder rechnergestützt verarbeitet. Basierend auf Daten von 3500 einzelnen Molekülbildern wurde die 3D-Struktur des SeV-F mit einer Auflösung von ca. 16 Å rekonstruiert. Die ersten Schritte der

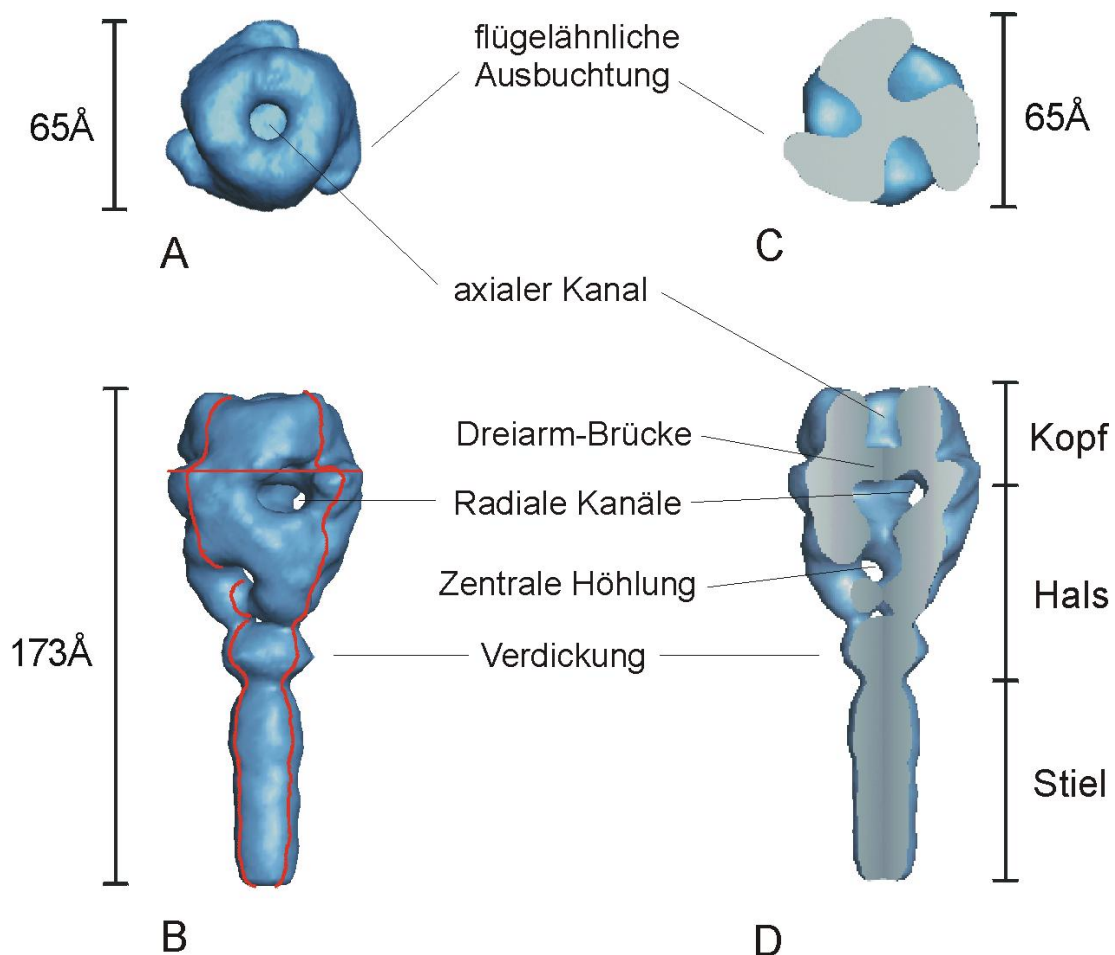


Abb. 4.1.6 3D-Struktur des Sendaivirus-F. (A) Ansicht von oben. (B) Ansicht von der Seite. Die zur Virushülle proximale Seite ist das untere Ende des Stiels. (C) Ansicht von oben auf einen horizontalen Schnitt (die Schnittebene ist durch die rote horizontale Linie im Bild B gekennzeichnet.) (D) Ansicht auf das axial angeschnittene Protein aus dem Bild B (die Schnittebene ist durch die roten vertikalen Linien markiert (45°)). Die verschiedenen Strukturdetails sind angegeben, weitere Details sind im Text erläutert. Mit freundlicher Genehmigung von K. Ludwig.

Strukturaufklärung wurden ohne Vorgabe von einer Symmetrie durchgeführt. Nach einigen iterativen Prozessen der Strukturaufklärung wurde deutlich, daß die Proteinstruktur eine dreifache Symmetrie aufweist, was auch mit den Ergebnissen der Crosslinking Experimente übereinstimmt (siehe Abschnitt 4.1.1).

Die 3D-Struktur der SeV-F-Ektodomäne ist in der Abbildung 4.1.6. dargestellt. Die Gesamtlänge der F-Ektodomäne beträgt 173 Å. Der distale Kopf der Ektodomäne hat eine Länge und eine Breite von jeweils ~ 65 Å. Dem Kopf folgt eine Halsregion, die sich zur Membran hin verjüngt und, bevor er zum Stiel übergeht, eine kugelförmige Verdickung bildet. Die Ansicht von oben zeigt flügelähnliche Ausbuchtungen im unteren Bereich des Kopfs. Außerdem weist der Kopf einen axialen Kanal, der durch eine massive Dreiarms-Brücke von radialen Kanälen getrennt wird, auf. Die radialen Kanäle verlaufen in der Mitte des Halses in eine zentrale Höhlung. Der Stiel hat eine Länge von 70 Å und einen Durchmesser von ~ 27 Å.

Es ist die erste 3D-Struktur des Sendaivirus-F-Proteins in der gespaltenen und fusionskompetenten F1+F2-Form.

4.2 Isolierung und Identifizierung des Fusionsproteins des Simianvirus 5

Das F-Protein des Simianvirus 5 (SV5) wurde aus nativen Viren, die auf MDBK-Zellen gezüchtet wurden, isoliert. Die Viren waren ohne jegliche Behandlung in der Lage, mit Ghosts zu fusionieren (siehe Abschnitt 4.3). Dies bedeutet, daß das SV5-F-Protein von den zellulären Proteasen in die fusionskompetitive Form F1+F2 gespalten worden war. Um zu überprüfen, ob sich alle F-Proteine im gleichen Zustand F1+F2 befanden, wurden die Viren mit Trypsin behandelt. Es ist bekannt, daß Trypsin den ungespaltenen Vorläufer des SV5-F in F1+F2 spaltet (*Paterson et al., 1989*). Die Fusionsaktivität der behandelten Viren wurde mittels R18-Assay untersucht. Nach der Trypsinbehandlung wurde keine Erhöhung der Fusionsaktivität festgestellt (Daten nicht gezeigt). Auch eine Analyse der Viren vor und nach der Trypsinbehandlung mittels SDS-PAGE zeigte keine Unterschiede im Proteinbandenbild (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das gesamte SV5-F bereits

tatsächlich durch die zelleigenen Proteasen gespalten wurde.

Zur Isolierung des SV5-F-Proteins war zunächst die Solubilisierung der Virushülle notwendig, um das Nukleokapsid und das M-Protein von den Spikeproteinen F und HN abzutrennen. Dazu wurden unterschiedliche Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (Tab. 4.2.). Die verwendeten Detergenzien Triton X-100, CHAPSO und Genapol C-100 eignen sich alle für die Isolierung integraler Membranproteine unter Beibehaltung ihrer nativen Struktur und biologischen Eigenschaften. Nach Zugabe der Tenside zu SV5 und einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Proben zentrifugiert, um das Nukleokapsid zu trennen. Die Proteine, die sich im Überstand bzw. im Pellet befanden wurden mittels SDS-PAGE visualisiert (Daten nicht gezeigt). Es konnte festgestellt werden, daß in allen Proben keine vollständige Trennung der Spikeproteine vom Nukleokapsid und dem Matrixprotein (M-Protein) gelungen war. Nach einer Dialyse der Detergenz-Extrakte und einer weiteren Zentrifugation, wurden nur in den Proben mit Zugabe von Triton X-100 das M-Protein und die Reste des Nukleokapsides ausgefällt (Abb. 4.2.1, Bahn P1 und P2). Für die Solubilisierung der Virushülle und die Isolierung der Spikeproteine des SV5 wurde daher Triton X-100 mit einer Endkonzentration von 2 % verwendet.

Tab. 4.2: Solubilisierung der Virushülle und Isolierung der Spikeproteine des SV5 mittels unterschiedlichen Detergenzien in unterschiedlicher Konzentration. Die erste Zentrifugation wurde nach Zugabe der Detergenzien zu den Viren und nach einer 30minütigen Inkubation bei RT durchgeführt. Die zweite Zentrifugation wurde durchgeführt, nachdem der Überstand aus der ersten Zentrifugation gegen ein Puffer mit niedriger Salzkonzentration dialysiert wurde. (- - nicht erfolgreich; + - erfolgreich)

Detergenz	Triton X-100		CHAPSO		Genapol C-100	
	2 %	5 %	0.5 %	1 %	1 %	2 %
Isolierung der Spikeproteine nach der 1. Zentrifugation	-	-	-	-	-	-
Isolierung der Spikeproteine nach der 2. Zentrifugation	+	+	-	-	-	-

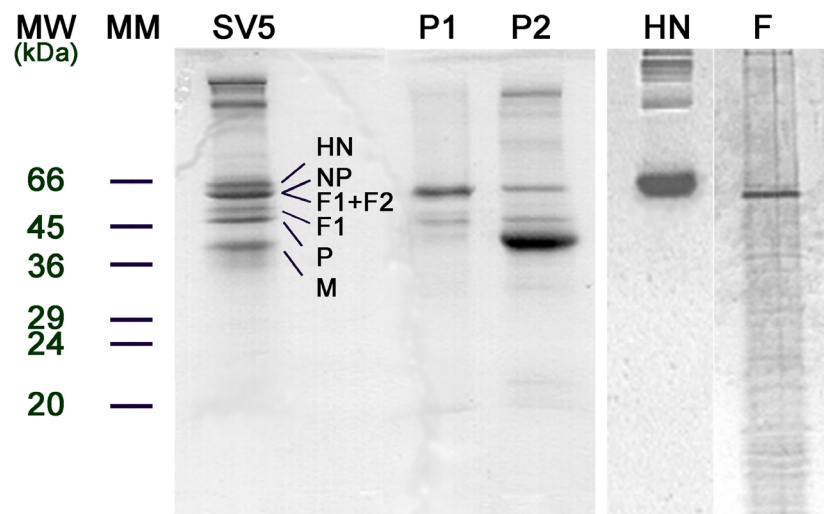


Abb. 4.2.1 SDS-PAGE des SV5 und der einzelnen Produkte während der Isolierung des F-Proteins unter reduzierenden Bedingungen: (P1) Pellet nach der ersten Zentrifugation, (P2) Pellet nach der zweiten Zentrifugation, (HN) isoliertes SV5-HN-Protein nach der Elution der Affinitätssäule, (F) isoliertes und aufkonzentriertes SV5-F-Protein. Das 10%ige Acrylamidgel wurde mit Coomassieblau gefärbt. Die Bahnen HN und F wurden zusätzlich einer Silberfärbung unterzogen. Links vom Gel sind die Molekulargewichtsmarker (MM) dargestellt.

Das F-Protein (Abb. 4.2.1, Bahn F) wurde vom HN-Protein (Abb. 4.2.1, Bahn HN) mittels Affinitätssäulenchromatographie getrennt (siehe "Material und Methoden"). Es wurde eine Fetuin-Agarose-Säule verwendet, wobei das HN an die N-Acetylneuraminidasesäure (NANA) des Fetuins bindet. Weil die Neuraminidaseaktivität des HN bei einem pH-Wert von 4.5 am höchsten ist (*Scheid et al., 1972*), wurde durch die Dialyse auch der pH-Wert des Detergenz-Extrakts auf 4.5 erniedrigt und alle Arbeitsschritte der Säulenchromatographie bei diesem pH-Wert durchgeführt. In der Abbildung 4.2.1, Bahn F ist zu sehen, daß das SV5-F-Protein erfolgreich isoliert wurde. Unter reduzierenden Bedingungen erscheint im Gel die (F1+F2)-Bande. Unter gleichen Bedingungen wurde die Bindung zwischen den Untereinheiten des SeV-F unterbrochen, und im Gel waren zwei Proteinbanden, die der F1- und der F2-Untereinheit entsprachen, zu identifizieren. Anscheinend reichte die verwendete Menge an β -Mercaptoethanol (5 % Endkonzentration) nicht aus, um die Disulfidbrücke zwischen F1 und F2 des SV5-F zu spalten.

Da die letzten Schritte der Proteinisolierung bei saurem pH stattfinden (siehe oben), mußte überprüft werden, ob die Behandlung des SV5-F mit einem niedrigen pH über einen

längeren Zeitraum einen Einfluß auf die Fusionsaktivität hat. Zu diesem Zweck wurden die Simianviren 5 mit R18 markiert und bis zu 6 h in einem NaAc-Puffer bei pH 4.5 und 4°C (die Dialyse und die Säulenchromatographie finden bei dieser Temperatur statt, siehe auch "Material und Methoden") vorinkubiert. Die Fusion von SV5 mit Ghosts wurde mittels R18-Assay bei 37°C, pH 7.4 gemessen. Es konnte kein Verlust der Fusionsaktivität des SV5-F nach der Vorinkubation des SV5 beim niedrigen pH-Wert festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

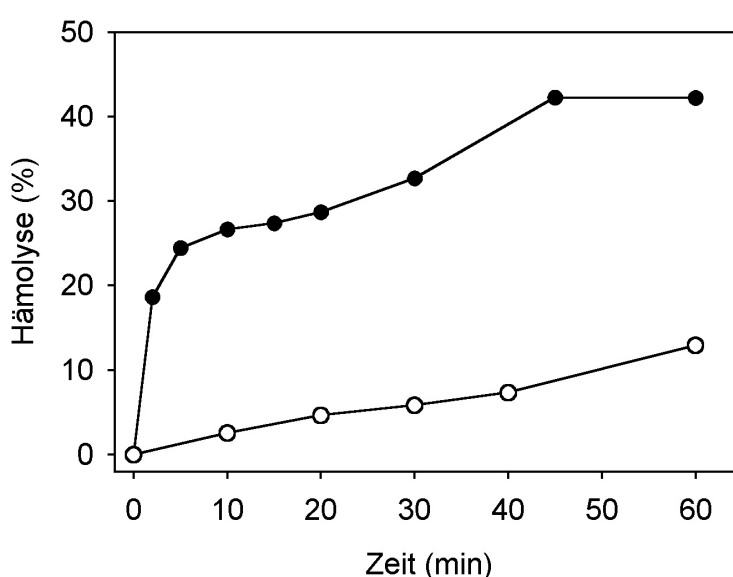


Abb. 4.2.2 Hämolyseaktivität des SV5 (●) oder des isolierten SV5-F (○). Nach dem Binden der Viren bzw. F-Virosomen (durch Zugabe von WGA) an Erythrozyten wurden die Proben bei 37°C inkubiert. Nach unterschiedlicher Zeit wurden Aliquots entnommen und die Hämolyse gemessen. Zur Berechnung des prozentualen Anteils der Hämolyse siehe „Material und Methoden“.

Die Fusionsaktivität des isolierten SV5-F wurde mittels Hämolysetests untersucht. Dazu wurde die F-Proteinsuspension zu RBC gegeben und in Anwesenheit von WGA bei 37°C inkubiert. Das isolierte SV5-F induziert eine Hämolyse von ca. 15 % nach einer 1stündigen Inkubation bei 37°C (Abb. 4.2.2). Die Hämolyseaktivität des SV5-F ist geringer als die des SV5. Das könnte wahrscheinlich durch die Abwesenheit des SV5-HN erklärt werden. Zu beachten ist, daß das SV5 im Gegensatz zu SeV selbst nach 1 h keine 100 %ige Hämolyse induzieren kann. Dies ist jedoch in Übereinstimmung mit den geringen Fusionsaktivitäten des

SV5 bei den physiologischen Fusionsbedingungen pH 7.4 und 37°C (siehe auch Abschnitt 4.3). Wenn RBC entweder nur mit WGA oder nur mit SV5-F inkubiert wurden, konnte keine Hämolyse festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen kann man schlußfolgern, daß die Hämolyse durch SV5-F, die mittels WGA an die RBC gebunden waren, ausgelöst wurde. Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß das isolierte SV5-F in Abwesenheit von HN Hämolyse induzieren kann.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der isolierten F-Proteine zeigten kurze filamentöse und rosettenförmige Assoziate des SV5-F (Abb. 4.2.3). Die Proteine hatten genügend Abstand voneinander und waren in unterschiedlichen Raumwinkeln vorhanden. Daher eignen sich die Proben mit den SV5-F-Proteinen, die nach der vorgestellten Methode isoliert wurde, für die Aufklärung der 3D-Struktur des SV5-F mittels Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse (siehe Abschnitt 4.1.3).

Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen deuten darauf hin, daß SV5-F eine ähnliche Form wie SeV-F hat. Es besteht aus einem globulären Kopf und einem dünnen Stiel. Die Arbeiten zur Aufklärung der 3D-Struktur des SV5-F werden demnächst begonnen.

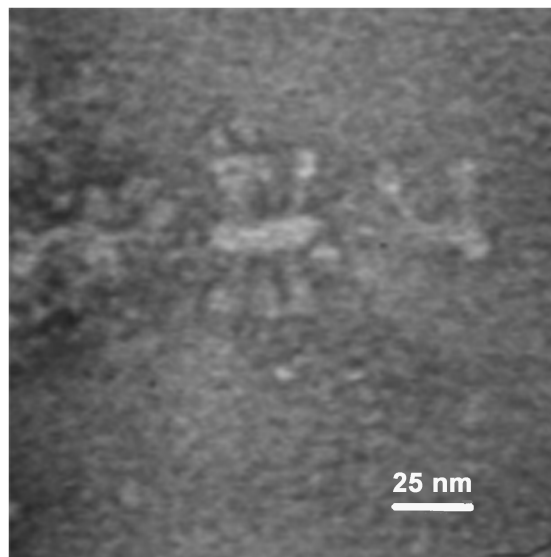


Abb. 4.2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme des isolierten SV5-F. Der Balken entspricht 25 nm.

4.3 Charakterisierung der Fusionsaktivität von Sendaivirus und Simianvirus 5

Um die 3D-Struktur des SeV-F bzw. des SV5-F im fusionsaktiven Zustand aufzuklären, muß man zunächst eine Konformationsumwandlung des F-Proteins vom fusionskompetenten zum fusionsaktiven Zustand induzieren. Der Auslöser der Konformationsänderung des Paramyxovirus-Fusionsproteins ist jedoch noch nicht bekannt. Daher wurde das Fusionsverhalten von Sendaivirus und Simianvirus 5 bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen untersucht, um physikochemische Bedingungen herauszufinden, bei denen eine Strukturänderung des isolierten F-Proteins induziert werden kann.

Die Fusionsaktivität der Viren wurde mittels R18-Fluoreszenzdequenching-(FDQ)-Assays gemessen (siehe „Material und Methoden“). Die Viren wurden mit dem Fluorophor R18 in selbstlöschender Konzentration markiert und als Target Erythrozytenghosts verwendet. Bei 4°C wurden die Viren an Ghosts gebunden, und die Fusion wurde durch den Transfer der Virus-Ghost-Suspension in PBS bei 37°C ausgelöst. In der Abbildung 4.3.1 sind typische Fusionskinetiken von SeV bzw. SV5 bei unterschiedlichen pH-Werten und 37°C dargestellt. Bei pH 7.4 beträgt das Ausmaß der SeV-Ghost-Fusion ca. 50 %. Obwohl das Fusionsausmaß des SeV bei pH 5.5 um ca. 10 % höher ist als bei pH 7.4, ist die Anfangsgeschwindigkeit der Fusion geringer. Es weist auch eine „lag“-Zeit (Zeitdauer zwischen dem Start der Fusionsmessung und der ersten meßbaren Erhöhung des FDQ) auf.

Im Gegensatz dazu ist bei SV5 nicht nur das Ausmaß sondern auch die Anfangsgeschwindigkeit der Fusion bei pH 5.5 viel höher als bei pH 7.4. Das Fusionsausmaß des SV5 steigt von 25 % bei pH 7.4 auf ca. 45 % bei pH 5.0. Bei basischem pH ist das Ausmaß und die Anfangsgeschwindigkeit der Fusion der beiden untersuchten Viren geringer als bei pH 7.4. Die Anfangsgeschwindigkeiten korrelieren mit den Ausmassen der Fusion.

Die pH-Abhängigkeit des Fusionsausmasses von SeV bzw. SV5 mit Ghosts wurde in der Abbildung 4.3.2 dargestellt. Da die Fusion von Paramyxoviren mit Targetzellen unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH-Wert stattfindet, wurde das Fusionsausmaß bei pH 7.4 als Kontrollwert auf 100 % angesetzt, und die anderen Meßwerte entsprechend normiert. Bei SeV beeinflußt die Änderung des pH-Wertes die Fusionsaktivität nur gering. Die Fusionsaktivität des SV5 erhöht sich deutlich bei sauren pH-Werten. Bei pH 5.0 ist das

Fusionsausmaß fast zweifach höher als der Kontrollwert. Die Verschiebung des pH-Wertes zum basischen hat nur einen geringen Einfluß auf die Fusionsaktivität des SV5.

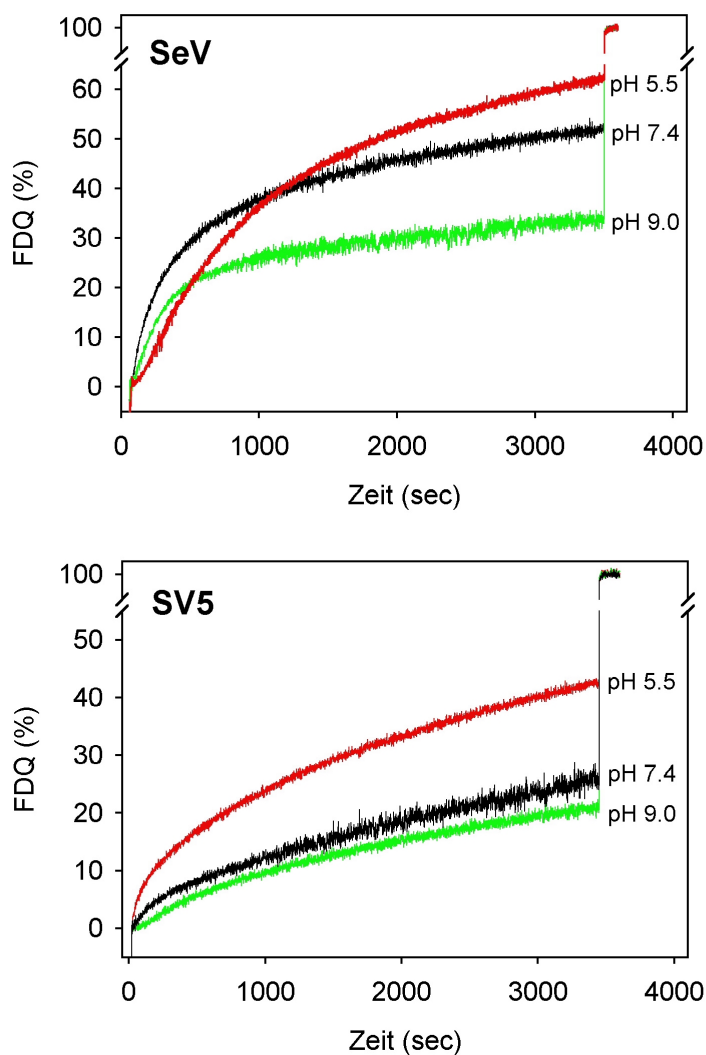


Abb. 4.3.1 Fusionskinetiken von Sendaivirus (SeV) und Simianvirus 5 (SV5) mit Erythrozytenghosts bei unterschiedlichen pH-Werten und 37°C. Die R18-markierten Viren wurden an Ghosts bei 4°C gebunden. Durch den Transfer der Virus-Ghosts-Suspension zum Zeitpunkt $t=0$ in eine Küvette mit Puffer bei 37°C wurde die Fusion ausgelöst. Am Ende der Messung wurde 0.5 % Triton zugegeben, um eine 100 %ige FDQ von R18 zu erreichen. Weitere Details siehe „Material und Methoden“.

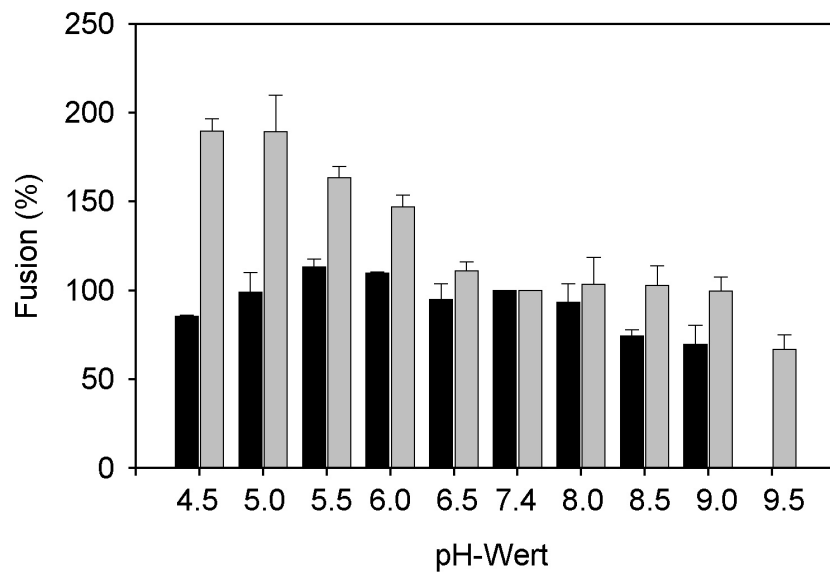


Abb. 4.3.2 pH-Abhängigkeit des Fusionsausmasses von Sendaivirus (schwarze Balken) oder Simianvirus 5 (graue Balken) mit Ghosts. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 1h bei 37°C. Das Fusionsausmaß bei pH 7.4 wurde als Kontrollwert auf 100 % angesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen dem jeweiligen Mittelwert, und die Fehlerbalken der Standardabweichung ($n \geq 3$).

Als nächstes wurde die Temperaturabhängigkeit der Fusionsaktivität des SeV bzw. SV5 mit Erythrozytenghosts untersucht (Abb. 4.3.3). Alle Messungen wurden bei pH 7.4 durchgeführt. Bei beiden Viren steigt die Fusionsaktivität mit der Erhöhung der Temperatur an. Das SeV hat bei den Temperaturen 20°C oder 25°C eine Fusionsaktivität von ca. 12 % bzw. ca. 20 %. Bei 37°C beträgt das Fusionsausmaß ca. 40 %. Wenn die Temperatur auf 60°C erhöht wird, steigt das Fusionsausmaß um 20 %. Auch die Fusionskinetiken bei den gemessenen Temperaturen unterscheiden sich deutlich voneinander. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Fusion bei 20°C und 25°C sind sehr niedrig. Die Kurven weisen eine „lag“-Zeit auf. Mit der Erhöhung der Temperatur verringert sich die „lag“-Zeit, und die Anfangsgeschwindigkeit sowie das Ausmaß der Fusion nehmen zu. Ein ähnliches Fusionsverhalten ist auch bei SV5 zu beobachten.

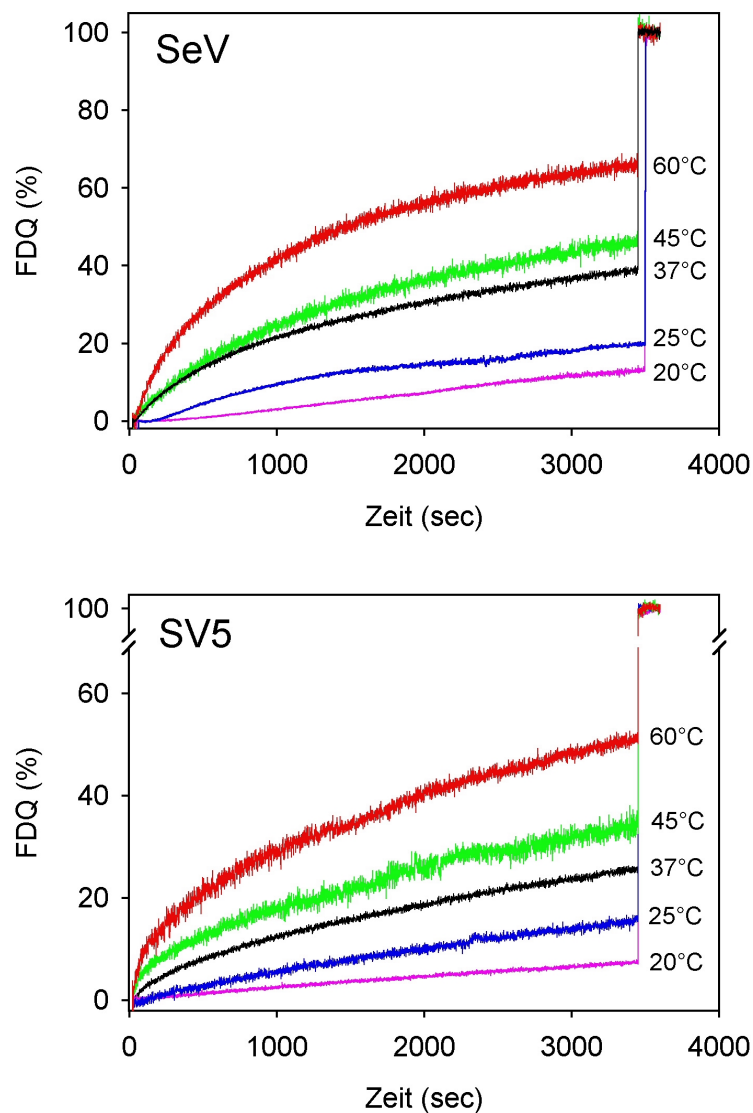


Abb. 4.3.3 Fusionskinetiken von Sendaivirus (SeV) und Simianvirus 5 (SV5) mit Erythrozytenghosts bei unterschiedlichen Temperaturen und pH 7.4. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde die Virus-Ghost-Suspension in 2 ml PBS mit entsprechender Temperatur zugegeben. Am Ende jeder Messung wurde 0.5 % Triton zugegeben, um ein maximales FDQ zu erreichen. Bei der Normierung der Kurven wurde dieser Wert als 100 % angesetzt. Weitere Details siehe „Material und Methoden“ und Text.

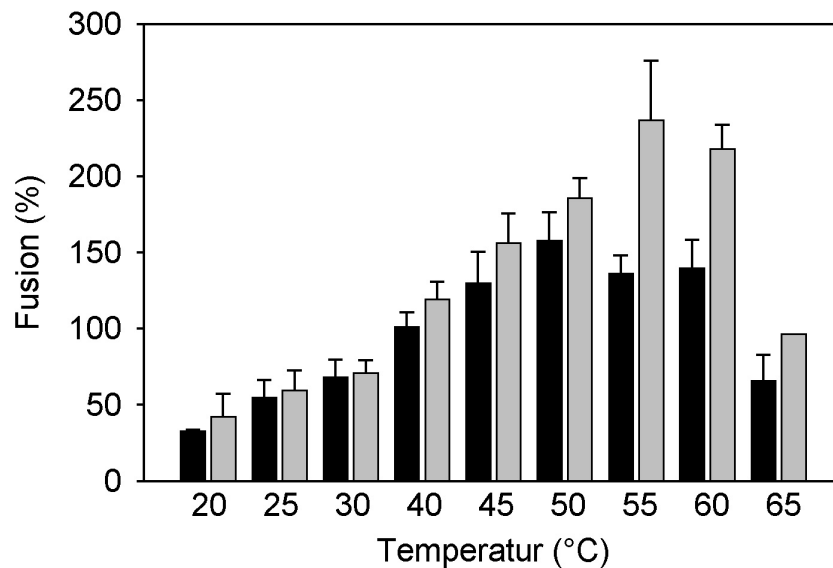


Abb. 4.3.4 Temperaturabhängigkeit der Fusion von Sendaivirus (schwarze Balken) oder Simianvirus 5 (graue Balken) mit Erythrozytenghosts. Alle Messungen wurden bei pH 7.4 durchgeführt. Das Fusionsausmaß bei 37°C wurde als Kontrollwert auf 100 % angesetzt. Gezeigt ist der Mittelwert, und die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichung ($n \geq 3$) gezeigt. Weitere Einzelheiten der Messungen siehe Text und Legende zur Abb. 4.1.1.

Die Temperaturabhängigkeit des Fusionsausmasses von SeV und SV5 mit Ghosts wurde in der Abbildung 4.3.4 dargestellt. Die ermittelten Fusionswerte wurden auf die entsprechenden Fusionswerte bei 37°C (100 %) normiert. Wie oben beschrieben, erhöht sich das Fusionsausmaß mit der Temperatur. Bei 50°C erreicht die Fusion von SeV mit Ghosts das Maximum. Bei SV5 ist ein drastischer Anstieg der Fusion bei 55°C zu beobachten. Bei 55°C steigt das Fusionsausmaß um das zweieinhalbfache gegenüber der Kontrolle. Mit einer weiteren Erhöhung der Temperatur nimmt die Fusion bei beiden Viren ab. Dies ist mit der Inaktivierung der viralen Fusionsproteine verbunden. Es ist bekannt, daß eine Inkubation von Sendaiviren ohne Target selbst bei 37°C zur Inaktivierung der Virusfusion führt (*Wharton et al., 2000*). Dieser Prozeß verläuft bei 37°C jedoch sehr langsam. Eine 50 %ige Verminderung der Fusionsaktivität wird nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C beobachtet (*Wharton et al., 2000*). Bei höheren Temperaturen werden SeV viel schneller inaktiviert. Nach einer 2-minütigen Vorinkubation von SeV ohne Target bei 56°C ist die Fusion von SeV mit Ghosts

um ca. 50 % reduziert (*Ohlwein, Baljinnyam und Herrmann, unveröffentlichte Resultate*). Dies legt die Vermutung nahe, daß die Fusionsaktivität der SeV ab 55°C abnimmt, weil möglicherweise die gleichzeitig stattfindende Inaktivierung der Viren schneller abläuft als bei niedrigeren Temperaturen. Das SV5 ist im Vergleich zum SeV stabiler. Die Fusion von SV5 wird bei der gleichen Temperatur langsamer inaktiviert. Nach einer 10 minütigen Vorinkubation von SV5 ohne Target bei 55°C verringert sich die Fusionsaktivität der Viren um 30 %, aber bei 60°C schon um ca. 65 % (*Ohlwein, Baljinnyam und Herrmann, unveröffentlichte Resultate*). Daher nimmt die Fusionsaktivität von SV5 erst ab 60°C ab, und nicht bei 55°C wie von SeV.

4.4 Einfluß von Lysolipiden auf die Fusion von Sendaiviren

Ein Fusionsprotein durchläuft mehrere Intermediate der Strukturänderung um eine Membranverschmelzung zu induzieren (siehe "Einführung"). Die Kenntnis der 3D-Struktur des Fusionsproteins in den einzelnen Intermediaten ist zum Verständnis des Fusionsmechanismus wichtig. Dazu müßten diese Intermediate "eingefangen" werden, um die Proteinstruktur aufzuklären. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Lysolipide die Fusion von unterschiedlichen Fusionssystemen auf einem bestimmten Zwischenschritt inhibieren (*Yeagle et al., 1994; Chernomordik et al., 1993; Vogel et al., 1993*). Daher soll geklärt werden, ob Lysolipide die Fusion von Sendaiviren hemmen.

Es wurde Lysophosphatidylcholin, Myristoyl, (LPC, 14:0) verwendet, und die Virus-Ghost-Fusion in An- bzw. Abwesenheit von LPC mittels FDQ-Assay unter Anwendung des lipidähnlichen Fluorophors R18 gemessen. Zunächst wurden die Lysolipide zur Ghost-Suspension bei 37°C und pH 7.4 zugegeben. Nach 4 min Inkubation wurden die markierten Viren hinzugefügt. In Anwesenheit von 17 µM LPC nahm die Virus-Ghost-Fusion von 28 % auf 6 % ab (Abb. 4.4.1). Die 17 µM Endkonzentration der Lysolipide entspricht 10 mol% der endogenen Lipide der Ghosts und Viren¹.

¹ Zur Fusionsmessung wurden auf 2 ml Endvolumen 50 µl Ghosts und 20 µl Viren verwendet. Bei Ghosts machen 50 % der Gesamtmasse Lipide aus, und bei Sendaiviren 26 %. Da der Anteil der viralen Lipide nur 2.75 mol% der gesamten endogenen Lipide im Fusionssystem ausmacht, wurde die gesamte Menge von Lysolipiden zur Ghost-Suspension zugegeben.

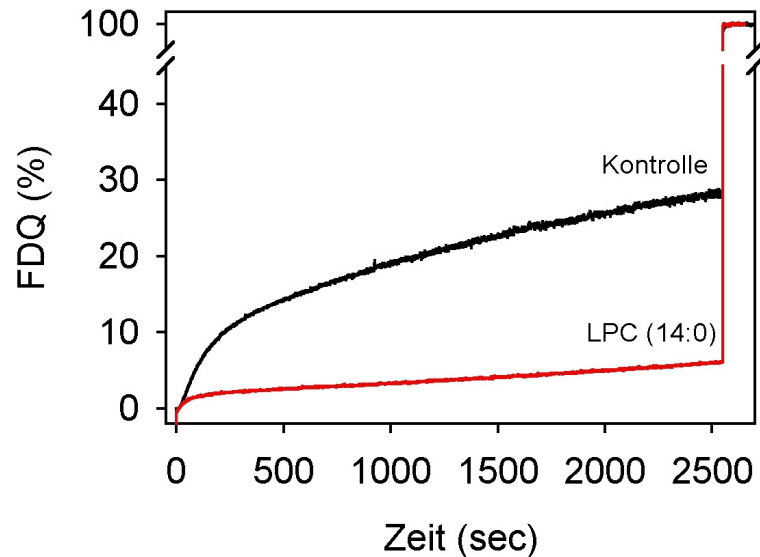


Abb. 4.4.1: Fusion von Sendaiviren mit Erythrozyten-Ghosts in Anwesenheit von 17 μM LPC (14:0) bei 37°C und pH 7.4. Die Kontrolle wurde ohne Lysolipidzugabe gemessen. Weitere Details siehe Text und "Material und Methoden".

Der inhibierende Einfluß von LPC war abhängig von der Menge der zugegebenen Lysolipide (Abb. 4.4.2). Wenn in Anwesenheit von 2 mol% LPC bezogen auf endogene Ghost- und Viruslipide (Endkonzentration 3.4 μM) die Virus-Ghost-Fusion um ca. 20 % gehemmt wurde, so in Anwesenheit von 10 mol% LPC wurde die Fusion um 80 % inhibiert. Damit könnte man Lysolipide zum "Einfangen" von Intermediaten der Sendaivirusfusion einsetzen. Es ist jedoch nicht eindeutig bewiesen, wie die Lysolipide die proteinvermittelte Fusion hemmen (siehe "Einführung"). Daher muß geklärt werden, ob der inhibierende Einfluß von Lysolipiden auf eine Wechselwirkung mit dem Fusionsprotein oder mit der Membran basiert.

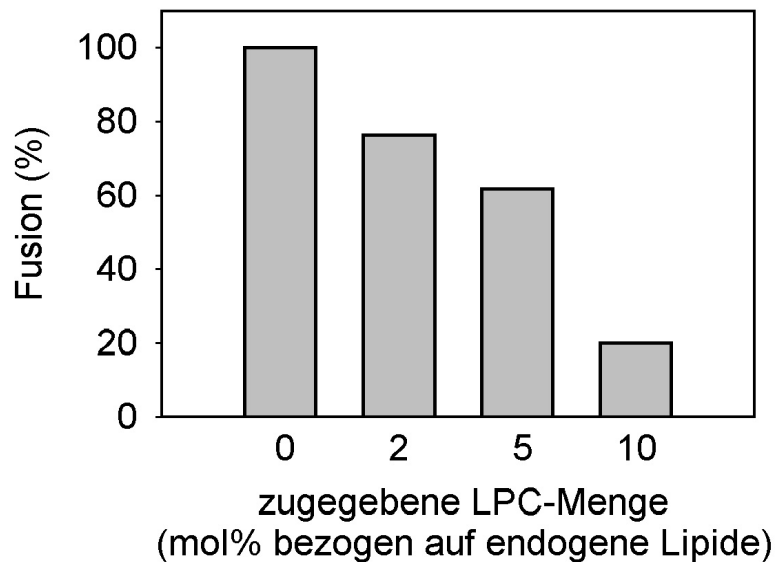


Abb. 4.4.2: Inhibierung der Sendaivirus-Ghost-Fusion durch Zugabe von LPC (14:0). Die Menge der zugegebenen Lysolipide bezieht sich auf endogene Lipide der Ghots und Viren. Die Virus-Ghost-Fusion wurde mittels R18-FDQ-Assay bei 37°C und pH 7.4 gemessen. Das Fusionsausmaß in Abwesenheit von LPC wurde als Kontrollwert auf 100 % angesetzt. Weitere Einzelheiten siehe Text und "Material und Methoden".

4.5 Wechselwirkung von Lysolipiden mit Influenzavirus

Die "Spinsonden-Technik" der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie bietet eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der Lipid-Protein-Wechselwirkung. An Hand der ESR-Spektren von spinmarkierten Lysolipiden (z.B. mit einer Nitroxidgruppe) könnte man klären, ob sich Lysolipide an das Fusionsprotein bindet oder in die Membran einbaut. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen spinmarkiertes LPC (SL-LPC, spinlabeled LPC) verwendet. Die Versuche wurden an Influenzaviren durchgeführt, weil im Gegensatz zu den Paramyxoviren das Auslösen der HA-vermittelten Fusion aufgrund der pH-Abhängigkeit der Strukturumwandlung des HA sehr gut steuerbar ist. Die Änderung der HA-Konformation läßt

sich auch in Abwesenheit einer Targetmembran durch Erniedrigung des pH-Wertes des Außenmilieus induzieren. Dies ermöglicht eine direkte Untersuchung der Wechselwirkung von Lysolipiden mit dem HA vor und nach der Konformationsumwandlung.

4.5.1 Inhibierung der Influenzavirus-Fusion durch SL-LPC

Zunächst wurde untersucht, ob das SL-LPC die HA-vermittelte Virus-Zell-Fusion in gleichem Maße inhibieren kann wie nicht spinmarkiertes LPC. Die Influenzavirusfusion wurde ebenso mittels R18-FDQ-Assay untersucht. Der Fluoreszenzmarker wurde in die Virushülle eingebaut und humane Erythrozytenghost dienten als Target. Die markierten Viren wurden bei neutralem pH-Wert an die Ghosts gebunden, und die Membranfusion wurde bei 37°C durch das Erniedrigen des pH-Wertes auf 5.0 ausgelöst. In Abwesenheit von SL-LPC war das Fusionsausmaß ca. 50 % (Abb. 4.5.1 A, Kontrolle).

Vor der Untersuchung des Einflusses von SL-LPC auf die Fusion wurde ermittelt, ob die Nitroxidgruppe des SL-LPC die Fluoreszenzintensität von R18 beeinflusst (paramagnetische Fluoreszenzlöschung). Dazu wurde das Analogon (13 µM Endkonzentration) zur Kontrollmessung zugegeben, nach dem das Fusionsausmaß ein Plateau erreicht hatte. Wie in der Abbildung 4.5.1 A gezeigt ist, konnte nur eine geringe Löschung der R18-Fluoreszenz durch die Nitroxidgruppe beobachtet werden (rechter Pfeil in Abb. 4.5.1 A). Aus der Kinetik dieses Abfalls ist auch ersichtlich, daß sich SL-LPC bei 37°C in weniger als 1 min in die Virushülle einbaut.

Nach einer Inkubation des Virus-Ghost-Komplexes mit SL-LPC (10 mol% bezogen auf endogene Virus- und Ghostlipide, 13 µM Endkonzentration) bei pH 7.4 und 37°C für 4 min wurde das Ausmaß der Membranfusion um ca. 1/3 erniedrigt (Abb. 4.5.1 A und Abb. 4.5.2). Bei der Berechnung des Fluoreszenzdequenchings und Darstellung der Fusionskurve wurde die Löschung der Markerfluoreszenz durch die Nitroxidgruppe berücksichtigt. Um den inhibierenden Einfluß von SL-LPC mit dem von nicht markierten LPC zu vergleichen, wurde die Fusion von Influenzaviren mit Ghosts in Anwesenheit von LPC mit unterschiedlichen Fettsäurenkettenlängen gemessen. In der Abbildung 4.5.1 B ist ein typisches Beispiel des LPC-Einflusses auf die Fusion gezeigt. Bei einer Konzentration von 10 mol% LPC (14:0) bezogen auf endogene Lipide von Ghost und Virus nahm die Membranfusion von ca.

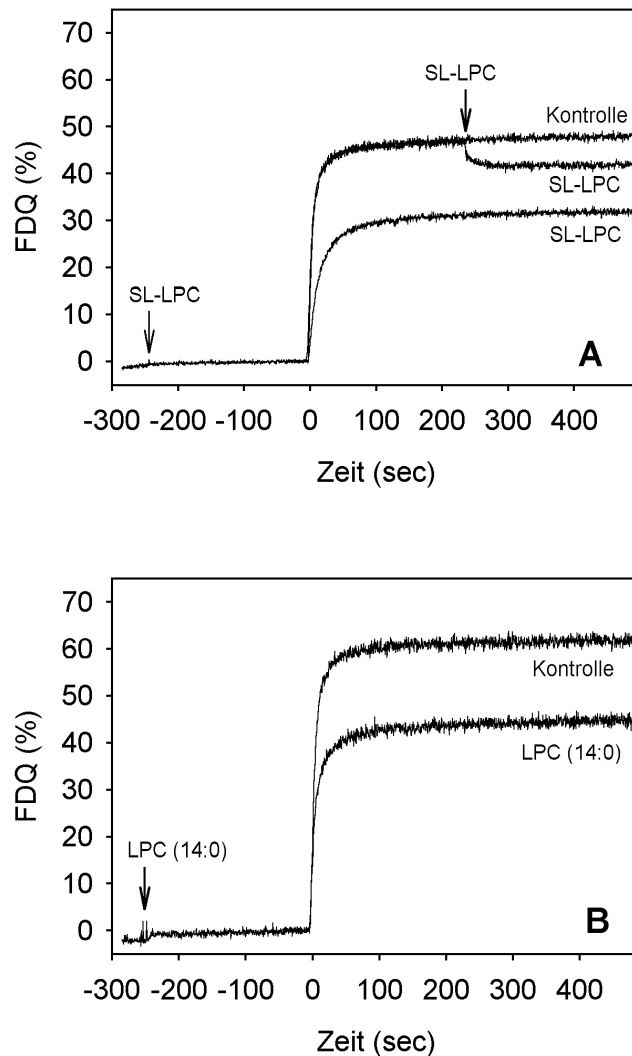


Abb. 4.5.1 Inhibition der Influenzavirus-Ghost-Fusion durch SL-LPC (A) oder LPC (14:0) (B) bei 37°C. Die Fusion wurde mittels R18-Assay gemessen (mehr dazu siehe Text und „Material und Methoden“). Bei $t = -240$ sec (Pfeile) wurde SL-LPC (A) oder LPC (B) zu der Virus-Ghost-Suspension in einer Küvette mit NaAc, pH 7.4 und 37°C, zugegeben (Kontrolle – ohne Zusatz von Lysolipiden), was mit einer leichten Erhöhung der R18-Intensität verbunden war. Dieser Effekt beruht auf der Aufhebung des R18-Quenchings durch den Einbau von Lysolipiden in die markierte Membran. Die Endkonzentration der Lysolipide betrug 13 μ M und entsprach 10 mol% der endogenen Lipide von Virus und Ghost. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde die Fusion durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 5.0 ausgelöst. Um die paramagnetische Löschung der R18-Fluoreszenz durch SL-LPC aufzuklären, wurde SL-LPC zur Virus-Ghost-Suspension nach dem Erreichen eines Fusionsplateaus zugegeben (rechter Pfeil in A). Der FDQ-Wert wurde -wie in „Material und Methoden“ angegeben- berechnet und im Falle von SL-LPC bezüglich des paramagnetischen Fluoreszenzlöschung korrigiert.

60 % (Kontrolle) auf 40 % ab. Bei dieser LPC-Konzentration (10 mol%) war der Unterschied des inhibierenden Einflusses in Abhängigkeit von der Fettsäurekettenlänge der benutzten LPCs nur sehr gering (Abb. 4.5.2). Diese Ergebnisse zeigen, daß SL-LPC ein geeignetes Analogon für LPC im Hinblick der Inhibierung der Influenzavirusfusion ist.

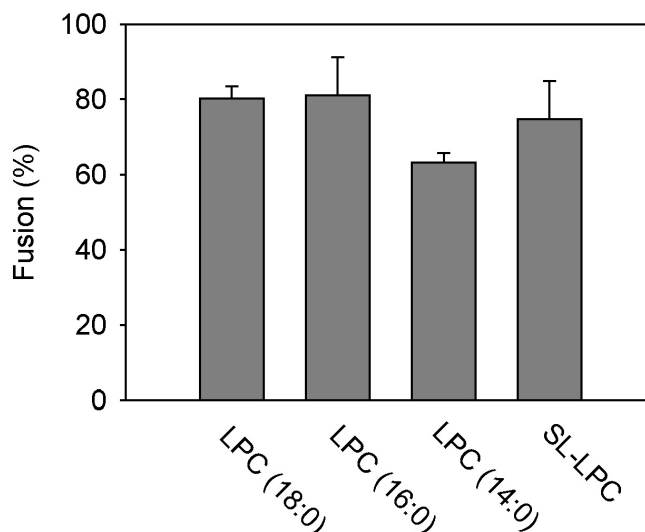


Abb. 4.5.2 Einfluß von Lysolipiden mit unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen und spinmarkierten LPC (18:0) (SL-LPC) auf die Fusion von Influenzaviren mit Ghosts bei 37°C. Das Fusionsausmaß ohne Zugabe von Lysolipiden wurde auf 100% angesetzt, und die dargestellten Fusionswerte darauf bezogen. Die Lysolipidkonzentration entsprach 10 mol% der endogenen Lipide von Virus und Ghost. Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ($n \geq 3$) angegeben.

4.5.2 Wechselwirkung von SL-LPC mit der HA-Ektodomäne

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von SL-LPC mit der HA-Ektodomäne wurde BHA isoliert (siehe „Material und Methoden“). Für diese Studien eignen sich isolierte vollständige HA-Moleküle nicht, weil die Lysolipide mit der hydrophoben Transmembrandomäne des HA interagieren würden und die Messungen zur Wechselwirkung mit der Ektodomäne erschweren würden.

Zuerst wurde geklärt werden, ob die biologischen Eigenschaften des HA durch die Isolierung beeinflusst worden ist. Dazu wurde der bis-ANS-Assay verwendet. Sowohl in

unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß die Strukturänderung der HA-Ektodomäne und die damit verbundene Freisetzung des hydrophoben Fusionspeptides kontinuierlich mittels des hydrophobizitätssensitiven Fluorophors bis-ANS verfolgt werden kann (Korte und Herrmann, 1994; Korte et al. 1999; Bethell et al. 1995). Die Abbildung 4.5.3 zeigt die Kinetik der bis-ANS-Fluoreszenzänderung in Anwesenheit von Influenzavirus und BHA bei pH 5.0 und 37°C. BHA oder intaktes Virus wurde zu einer vorgewärmten Puffer mit bis-ANS-Zusatz bei pH 7.4 zugegeben. Nach der Änderung des pH-Wertes auf 5.0 wurde eine schnelle Erhöhung der Fluoreszenzintensität von bis-ANS beobachtet. Diese Änderung beruht auf einer verstärkten Bindung von bis-ANS an hydrophobe Sequenzen der HA-Ektodomäne, die durch die Konformationsänderung freigelegt wurden, und damit einer erhöhten Quantenausbeute des Fluorophors. Wie die Messungen zeigten, war die Konformationsänderung von BHA nach der Erniedrigung des pH-Wertes vergleichbar mit der eines im intakten Virus vorhandenen HA (Abb. 4.5.3).

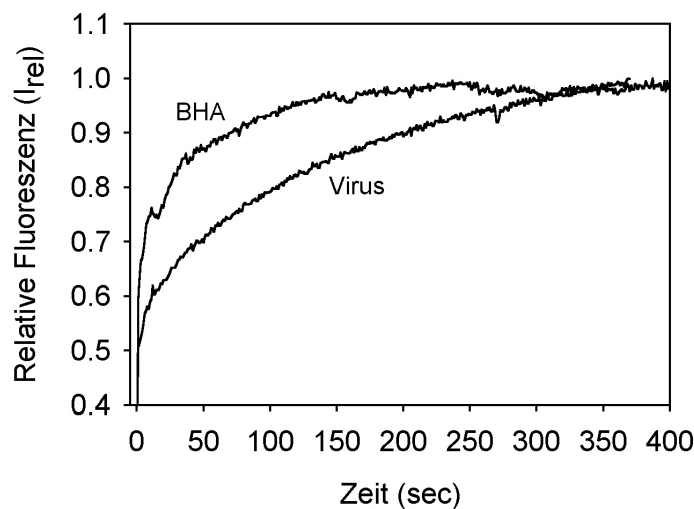


Abb. 4.5.3 Erhöhung der Fluoreszenzintensität von bis-ANS in Anwesenheit von intaktem Virus oder BHA bei pH 5.0 und 37°C. BHA (5 µg/ml) oder Influenzavirus (5 µg HA/ml unter Annahme der Verhältnisse 2.5×10^{12} Viruspartikel/mg Virusprotein sowie 500 Trimere/Virion und eines Molekulargewichts des HA von 75-80 kDa) wurde zu 2 ml NaAc-Puffer mit 1 nmol bis-ANS/ml bei pH 7.4 und 37°C zugegeben. Bei t=0 wurde der pH-Wert durch Zugabe von Zitronensäure erniedrigt. Weitere Details siehe „Material und Methoden“.

Es ist auch bekannt, daß das HA nur nach einer Konformationsänderung zugänglich für Proteinase K wird (*Doms et al., 1985*). Der Proteinase K-Sensitivitätstest zeigte ebenso, daß die BHA-Moleküle durch die Isolierung nicht beschädigt wurden. Nach einer Inkubation bei saurem pH wurde das BHA genauso durch Proteinase K abgebaut, wie das HA im nativen Virus (Daten nicht gezeigt).

Die Wechselwirkung von SL-LPC mit BHA wurde mittels ESR-Spektroskopie bei 37°C untersucht. Um eine ausreichende Signalintensität von BHA-gebundenen SL-LPC zu erreichen, wurde eine höhere SL-LPC-Konzentration als bei den Fusionsversuchen verwendet. Zunächst wurde ein Spektrum von SL-LPC (63 µM Endkonzentration) in wäßriger Lösung in Abwesenheit von BHA aufgenommen. Die Abbildung 4.5.4 A3 zeigt ein ESR-Spektrum aus drei schmalen Linien, die typisch für monomeres, sich frei in der Lösung bewegendes Lipid sind. Es sind keine SL-LPC-Mizellen vorhanden, diese wären durch eine Verbreiterung der Spektrenlinien aufgrund der Spin-Spin-Wechselwirkung von SL-LPC in Mizellen zu identifizieren. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß die SL-LPC Konzentration unter oder sehr nah an der kritischen Mizellarkonzentration liegt.

In Anwesenheit von BHA (molares Verhältnis von BHA-Monomeren zu SL-LPC = 1:1.5) besteht das Spektrum aus zwei überlagerten Komponenten (Abb. 4.5.4 A1, A2). Neben einer mobileren Komponente ist auch eine immobilisierte Komponente zu erkennen. Die immobilisierte Komponente, die durch die Bindung von SL-LPC an BHA hervorgerufen wird, ist bei pH 5.0 stärker ausgeprägt (Abb. 4.5.4 A2) als bei neutralem pH (Abb. 4.5.4 A1). Bei der Aufnahme des Spektrums bei saurem pH erfolgte die Erniedrigung des pH-Wertes nach der Zugabe von SL-LPC zu der BHA-Suspension, um eine mögliche Abschirmung hydrophober Bindungsstellen für SL-LPC durch Proteinaggregation zu verhindern. Um den Anteil des gebundenen SL-LPC zu bestimmen, wurde von den Spektren von SL-LPC in Anwesenheit von BHA das Spektrum von SL-LPC in wäßriger Lösung subtrahiert. Die Differenzspektren sind in der Abbildung 4.5.4 B dargestellt. Leider war es nicht möglich, die mobile Komponente der Spektren vollständig zu subtrahieren. Unter Vernachlässigung dieser kleinen Komponente wurde der Anteil der immobilisierten SL-LPC bestimmt. Während bei neutralem pH 30 % des gesamten SL-LPC an BHA gebunden waren, betrug der Anteil des mit BHA assoziierten SL-LPC bei pH 5.0 64 %. Das Spektrum des gebundenen SL-LPC bei pH 5.0 war stärker immobilisiert (siehe Pfeile in der Abb. 4.5.4 B) als bei neutralem pH-Wert. Die Bindung von SL-LPC an BHA bei saurem pH-Wert war

irreversibel. Nach der Reneutralisation der Suspension blieb der Anteil des an BHA gebundenen SL-LPC konstant (Daten nicht gezeigt).

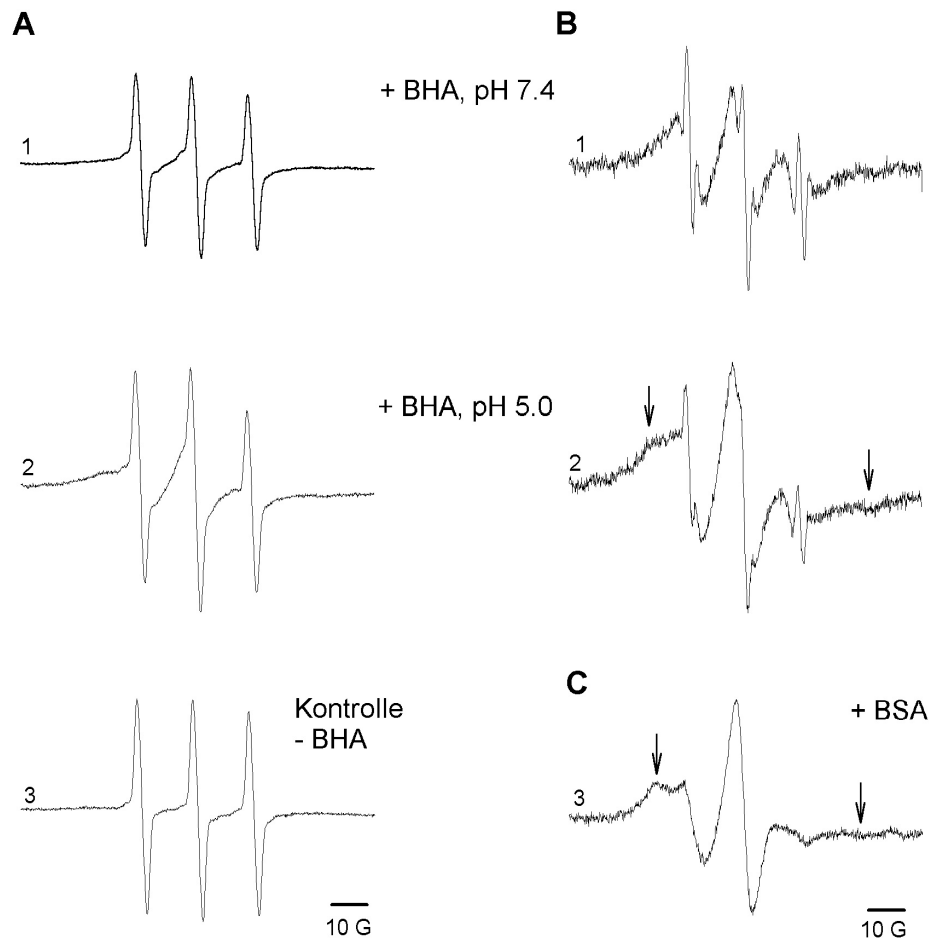


Abb. 4.5.4 Wechselwirkung von SL-LPC mit BHA. A: das obere (A1) und das mittlere (A2) Spektrum wurden in Anwesenheit von BHA bei pH 7.4 bzw. bei pH 5.0 aufgenommen (molares Verhältnis von BHA-Monomer : SL-LPC = 1:1.5). Das untere Spektrum (A3) entspricht SL-LPC in einer wässrigen Umgebung (ohne Zugabe von BHA). Die Skala der Spektren A1 und A2 entspricht der zweifachen (pH 7.4) bzw. vierfachen (pH 5.0) des Spektrums A3. B: Das obere und das mittlere Spektrum wurden durch Subtraktion des Spektrums A3 vom Spektrum A1 bzw. A2 mittels ESR Softwares ermittelt. Es entspricht den an BHA gebundenem SL-LPC bei pH 7.4 (B1) bzw. pH 5.0 (B2). Bei saurem pH ist der Anteil der gebundenen SL-LPC (Pfeile) größer als bei neutralem pH. C: Das Spektrum von SL-LPC in Anwesenheit von BSA (molares Verhältnis von BSA:SL-LPC = 1:1.8). Das ESR-Spektrum zeigt eine starke Bindung (Pfeile) der SL-LPC-Analoga. Alle Spektren wurden bei 37°C mit einer Modulationsamplitude von 4 G und einer Scanbreite von 100 G aufgenommen. Der pH-Wert der entsprechenden BHA-Suspension wurden in Anwesenheit von SL-LPC auf 5.0 erniedrigt.

Dennoch ist diese Bindung von SL-LPC an BHA bei saurem pH-Wert schwach im Vergleich zur Bindung von SL-LPC an das fettsäure- und lipidbindende Protein BSA (Bovines Serumalbumin) (Abb. 4.5.4 C). Bei einem molaren Verhältnis von BSA:LPC von 1:1.8 besteht das Spektrum nur aus einer immobilisierten Komponente. Das Fehlen von schmalen Linien deutet daraufhin, daß die gesamte Menge von SL-LPC an BSA gebunden ist.

4.5.3 Wechselwirkung von SL-LPC mit Influenzaviren

Bei der Untersuchung der Wechselwirkung von SL-LPC sowohl mit intakten als auch mit Bromelain-behandelten Viren wurde das gleiche molare Verhältnis von SL-LPC zu endogenen Lipiden (1:10) wie bei den Fusionsmessungen eingesetzt. Dies entspricht einem Verhältnis von SL-LPC zu HA-Monomeren von 1:5 (siehe "Material und Methoden"). In Anwesenheit von intaktem Virus bestand das SL-LPC-Spektrum aus zwei Komponenten: einer kleinen mobilen Komponente (schmale Linien), entstanden durch die sich im Suspensionsmedium frei bewegenden SL-LPC-Monomere (wie oben beschrieben), und einer immobilisierten Komponente, die typisch für ein Membranspektrum ist. In der Abbildung 4.5.5 sind die Membranspektren von intakten bzw. Bromelain-behandelten Viren bei den pH-Werten 7.4 und 5.0 (Abb. 4.5.5, A und B, C und D) nach der Subtraktion der mobilen Komponente dargestellt. Die Erniedrigung des pH-Wertes erfolgte wieder nach Zugabe von SL-LPC zu den Viren. Die Subtraktion ergab, daß der Anteil der freien SL-LPC weniger als 4 % der Gesamtmenge entspricht. Die Spektren wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Durch zusätzliche Experimente konnte gezeigt werden, daß sich SL-LPC im äußeren Leaflet befindet. Es ist bekannt, daß BSA Lipide nur aus der äußeren, aber nicht aus der inneren Leaflet extrahieren kann (*Morrot et al., 1989*). Nach Zugabe von BSA zu den markierten Viren wurde das gleiche immobilisierte Spektrum von SL-LPC mit BSA in Abwesenheit von Membranen erhalten (Abb. 4.5.4 C). Folglich wurde die gesamte Menge von SL-LPC aus der Membran extrahiert und an BSA gebunden.

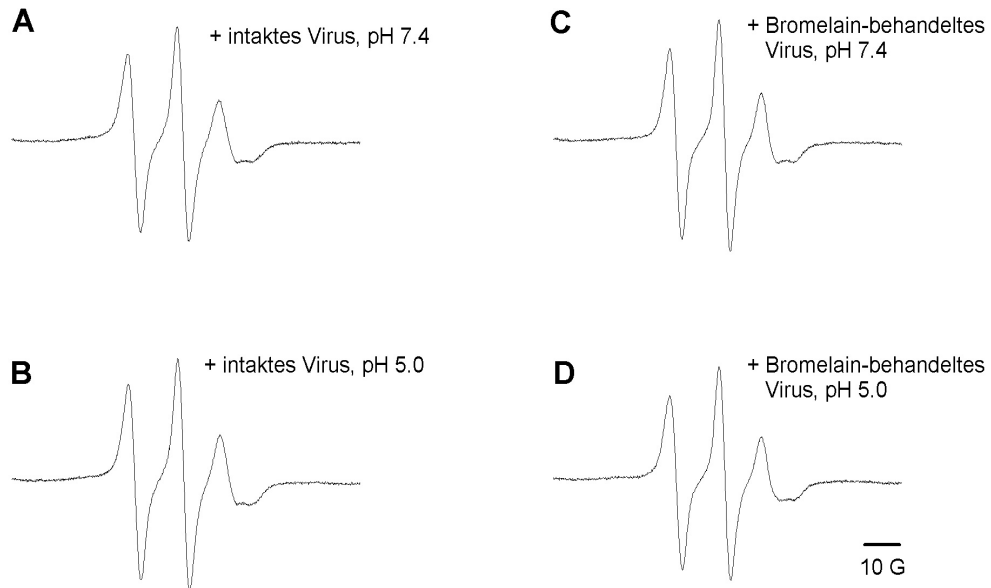


Abb. 4.5.5 Wechselwirkung von SL-LPC mit intaktem (A und B) oder Bromelain-behandeltem Influenzavirus (C und D) bei pH 7.4 (A und C) bzw. pH 5.0 (B und D). Die Gesamtmenge von SL-LPC entspricht 10 mol% der endogenen Lipide in der Virushülle. Das molare Verhältnis von HA-Monomeren zu SL-LPC beträgt 1:5. Pfeile bezeichnen immobilisierte Komponenten. Für weitere Details siehe „Material und Methoden“ und Text. Die Spektren wurden bei 37°C mit einer Modulationsamplitude von 4 G und einer Scanbreite von 100 G aufgenommen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Affinität von SL-LPC zur viralen Membran stärker ausgeprägt ist als zur HA-Ektodomäne. Um dies zu überprüfen, wurden Ei-PC-SUV mit SL-LPC in einem Verhältnis von SL-LPC:Ei-PC = 1:10 (wie bei SL-LPC zu Virus-Ghost-Komplex) markiert. Erneut wurde ein Zwei-Komponenten-Spektrum mit einer kleinen mobilen und einer immobilen Komponente, die auf in die äußere Leaflet eingebautes SL-LPC zurückzuführen ist, erhalten. Die Membrankomponente wurde durch die Zugabe von BHA sowohl beim neutralen pH-Wert als auch beim sauren pH-Wert nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Das molare Verhältnis von SL-LPC zu BHA-Monomer entsprach dem von SL-LPC zu HA im intakten Virus (5:1). Diese Ergebnisse zeigen, daß (a) BHA nicht in der Lage ist, SL-LPC aus der Membran in einer nachweisbaren Menge zu extrahieren und (b) SL-LPC eine höhere Affinität zum Lipidbilayer als zu BHA hat.

4.6 Fluoreszenzmikroskopische Studien am exprimierten Sendaivirus-F-Protein und dessen Chimären

In diesem Teil der Arbeit wurde die Rolle der transmembranalen und zytoplasmatischen Domäne des Sendaivirus-F-Proteins für den Fusionsprozeß und entsprechende Intermediate untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Chimären des SeV-F konstruiert, deren transmembranale und/oder zytoplasmatische Domäne durch die äquivalenten Domänen der Influenzavirus-HA oder des membranständigen Proteins CD4 ersetzt wurden (siehe Tab. 3.1). Die Proteine wurden unter Anwendung eines transienten T7-RNA-Polymerase-Vakziniavirus-Expressionssystems auf CV1-Zellen exprimiert (siehe "Material und Methoden"). Nach der Bindung der fluoreszenzmarkierten Targetzellen an Expressionszellen wurde die proteinvermittelte Zell-Zell-Fusion durch eine Inkubation bei 37°C ausgelöst und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Es wurden doppelmarkierten Targetzellen verwendet. Um die Fusionsintermediate, die Lipidvermischung und die Öffnung kleiner wässrigen Fusionsporen aufzulösen, war die Plasmamembran der Targetzellen mit R18 und das Zytosol mit Calcein markiert.

4.6.1 Notwendigkeit der Co-Expression von HN

Die Arbeiten von *Bousse et al., 1994* und *Tanabayashi und Compans, 1996* belegen, daß bei Sendaiviren die Co-Expression von F und HN für die proteinvermittelte Zell-Zell-Fusion notwendig ist. Bei diesen Untersuchungen wurden aber Targetzellen verwendet, die keine spezifischen Rezeptoren für das SeV-F besitzen. In der vorliegenden und früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß das SeV-F in Abwesenheit von HN eine Fusion mit HepG2-Zellen vermitteln kann, vermutlich aufgrund einer Wechselwirkung mit ASGP-Rezeptoren (*Bagai et al., 1993; Leyrer et al., 1998*). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob auch das exprimierte SeV-F eine Fusion mit HepG2-Zellen induzieren kann. Das Sendaivirus-F (Fwt) oder eine der F-Chimären wurden ohne HN auf CV1-Zellen exprimiert und die CV1-Zellen mit R18 und Calcein doppelmarkierten HepG2-Zellen bei 4°C inkubiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte festgestellt werden, daß nur 1 bis 2 HepG2-Zellen pro CV1-Zellen gebunden waren. Zum Auslösen der Zell-Zell-Fusion wurden die

Petrischalen mit den Zellen bei 37°C unterschiedlich lange (max. 3 Stunden) inkubiert. Es wurde ein Übergang weder der R18- noch der Calcein-Moleküle von HepG2-Zellen auf CV1-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die ohne HN exprimierten Fwt bzw. F-Chimären konnten auch keine Fusion mit markierten Erythrozyten (RBC), die durch WGA an den CV1-Zellen gebunden waren, vermitteln (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Daten wurde geschlußfolgert, daß eine Co-Expression des Sendaivirus-HN für unsere weitere Untersuchungen der SeV-F-vermittelten Zell-Zell-Fusion notwendig ist.

Als nächstes wurde das Mengenverhältnis der zu exprimierenden F und HN ermittelt, bei dem die Fusionsrate am höchsten ist. Unterschiedliche Mengen an Fwt- und HN-Plasmiden wurden bei der Transfektion der CV1-Zellen eingesetzt. Die Bindung von doppelmarkierten RBC an Expressionszellen sowie die Fusion zwischen RBC und CV1-Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Wenn HN ohne Fwt exprimiert wurde, war die Bindung der Erythrozyten sehr hoch (Abb. 4.6.1; schwarze Balken). Alle Zellen auf der Petrischale hatten mehr als 10 RBC gebunden. Bei allen anderen Ansätzen mit Fwt war die Bindung geringer als wenn nur HN exprimiert wurde, aber vergleichbar miteinander (Abb. 4.6.1; schwarze Balken). Der Anzahl der gebundenen RBC pro CV1-Zelle betrug 5-8. Zur Bestimmung des Fusionsausmaßes wurde die Anzahl der CV1-Zellen, die fluoreszenzmarkiert waren, und die Anzahl der nicht markierten CV1-Zellen, an denen RBC gebunden waren, nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C ermittelt. Basierend auf der Summe dieser Zellen wurde der Prozentsatz der fusionierten Zellen bestimmt. Wenn nur HN exprimiert wurde, fand keine Fusion statt. Bei einem Verhältnis von Fwt-cDNA zu HN-cDNA von 1:2 (w/w) war die Anzahl der fusionierten Zellen am höchsten (Abb. 4.6.1; graue Balken). Zu beachten ist, daß bei den unterschiedlichen Ansätzen alle fusionierten Zellen doppelmarkiert waren. Das heißt, daß sowohl eine Membranverschmelzung als auch eine Öffnung wäßriger Poren stattgefunden hatte. Für weitere Experimente wurden die CV1-Zellen jeweils mit Fwt- bzw. F-Chimäre-cDNA und HN-cDNA in einem Mengenverhältnis von 3 µg:6 µg transfiziert.

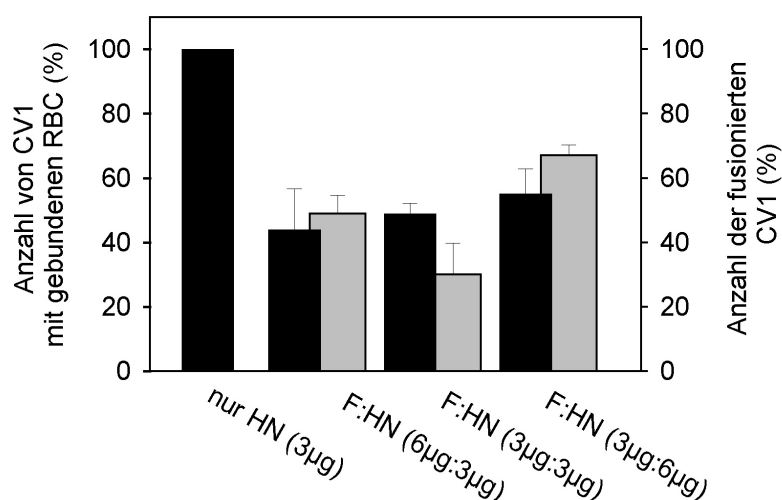


Abb. 4.6.1 Ausmaß der Bindung der Targetzellen (schwarze Balken) und der Fusion (graue Balken) an CV1-Zellen, die mit unterschiedlichen Mengen an cDNA von SeV-HN und SeV-F transfiziert wurden. Nach der Transfektion der CV1-Zellen wurden fluoreszenzmarkierte Erythrozyten zugegeben und bei 4°C gebunden. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert, um die Fusion zu induzieren. Die Bindung der Targetzellen und die Fusion wurde anhand der Fluoreszenzmarker mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Für weitere Details siehe „Material und Methoden“ und Text. Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt ($n \geq 3$).

4.6.2 Einfluß der Substitution der F-Domänen auf die Zell-Zell-Fusion

Die Untersuchung der Fusion der Fwt-, FFH-, FHF-, FHH-, F4F- bzw. F44- (siehe Tab. 3.1) exprimierenden CV1-Zellen mit RBC wurde wie in "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt. Nach der Bindung der doppelmarkierten RBC an CV1 wurde die Zell-Zell-Fusion durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C ausgelöst. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde bei Fwt-, FFH- und FHF-exprimierenden Zellen der Übergang von R18 und Calcein beobachtet, was auf eine Vermischung der Plasmamembran und Öffnung kleiner wäßrigen Poren hinweist. Nach 30 min war ein weiterer Anstieg der Zahl der fusionierten Zellen zu verzeichnen, und auch bei FHH-exprimierten Zellen fand der Übergang beider Fluorophoren statt. Die F4F-exprimierenden CV1-Zellen waren nach 45 min doppelmarkiert. Erst nach 1 h wurde bei F44 der Übergang von R18 beobachtet, der

Übergang von Calcein wurde auch nach einer längeren Inkubation (2 h) nicht registriert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Verteilung der Fluorophore nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C sind in der Abbildung 4.6.2 gezeigt.

Die Zell-Zell-Fusion, die durch das Fwt oder einer der F-Chimären vermittelt wurde, war nicht nur im zeitlichen Verlauf unterschiedlich, sondern auch im Ausmaß. In der Tabelle 4.3 ist die Verteilung der beiden Fluorophore bei den untersuchten Proteinen qualitativ verglichen. Da das Fusionsausmaß unter anderem von der Anzahl der gebundenen Targetzellen abhängig sein könnte, wurde auch die Bindung der RBC angegeben.

Bei allen Chimären, außer F44 und FHF, wurde eine ähnlich starke Bindung von Targetzellen wie bei Fwt festgestellt. Die F44- und FHF-exprimierenden Zellen hatten weniger RBC gebunden. Trotz einer vergleichbaren RBC-Bindung war der Übergang von R18 bei allen Chimären geringer als bei Fwt. Besonders bei F44 waren nur wenige Zellen rot markiert. Der Vergleich des Calcein-Übergangs zeigt noch mehr Unterschiede zwischen den Chimären und Fwt. Nur bei FFH waren alle Zellen wie bei Fwt-exprimierenden Zellen doppelmarkiert. Bei den Chimären FHF, FHH und F4F wiesen nur ein geringer Anteil der rot markierten Zellen eine grüne (Calcein) Markierung auf. Wie oben bereits erwähnt, fand bei den F44-exprimierten Zellen kein Calcein-Übergang statt.

Tab. 4.3: Qualitativer Vergleich des Ausmaßes der Bindung von Targetzellen (RBC) an CV1-Zellen und des durch die Fusion bedingten R18- bzw. Calcein-Übergangs auf CV1-Zellen, die F-Protein bzw. Chimären exprimieren. (+++ - viele Zellen, ++ - einige Zellen, + - einzelne Zellen, - - keine Zellen)

	Fwt	F4F	F44	FFH	FHF	FHH
Bindung von RBC	+++	+++	++	+++	++	+++
R18-Übergang	+++	++	+	++	++	++
Calcein-Übergang	+++	+	-	++	+	+

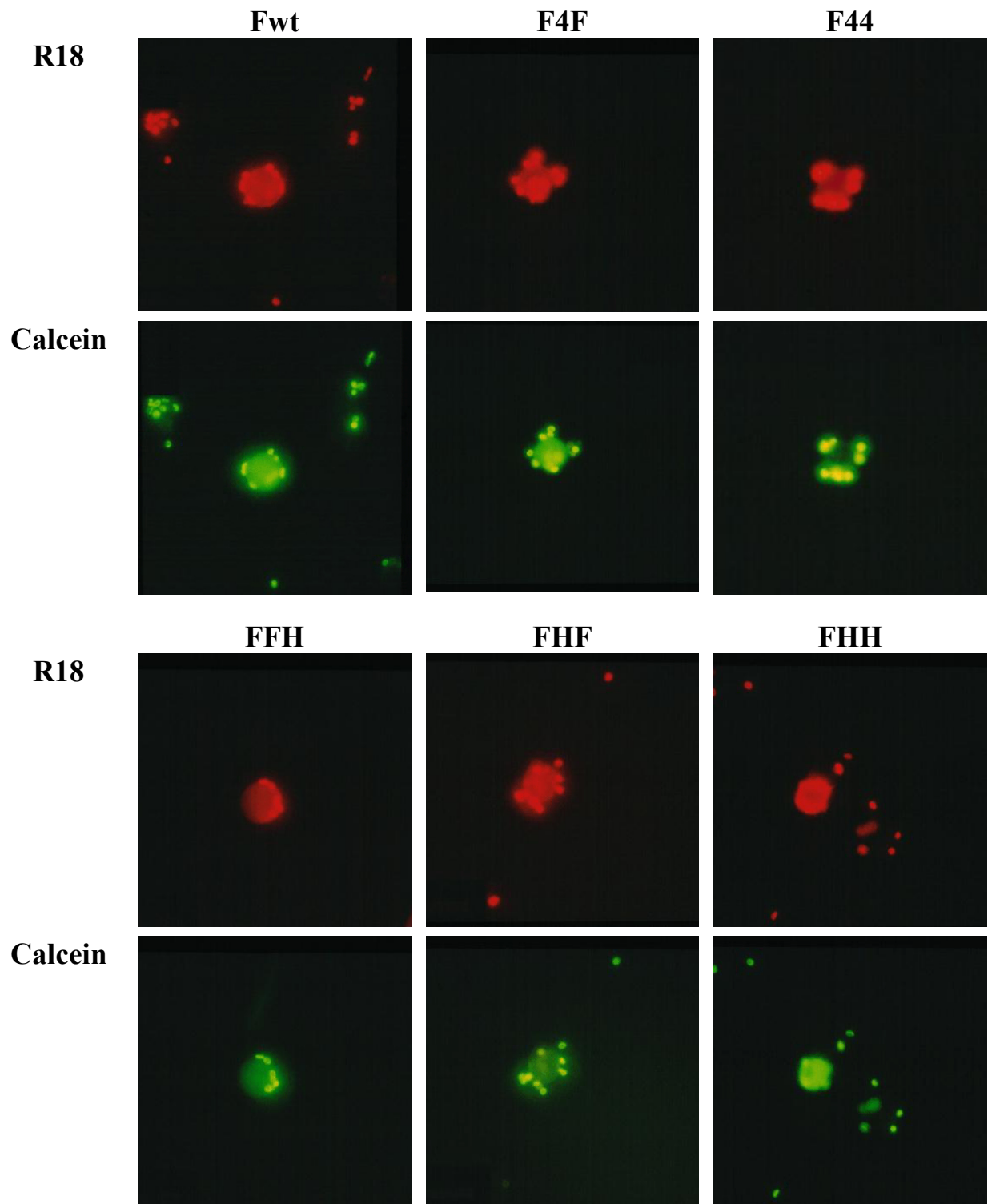


Abb. 4.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Markerverteilung während der proteinvermittelten Zell-Zell-Fusion. An Fwt-, F4F-, F44-, FFH-, FHF- und FHH-exprimierende CV1-Zellen waren doppelmarkierte (R18 und Calcein) Erythrozyten gebunden und die Fusion wurde nachfolgend durch eine Inkubation bei 37°C ausgelöst. Die Bilder des R18- (1. und 3. Reihe) und Calcein-Übergangs (2. und 4. Reihe) auf die CV1-Zellen wurden bei RT 1 h nach dem Auslösen der Fusion aufgenommen. Für weitere Details siehe "Material und Methoden" und im Text.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Substitution der transmembranalen und/oder zytoplasmatischen Domäne des SeV-F durch HA-Domänen keinen Einfluß auf die Fusionsaktivität des F-Proteins haben. Die F-HA-Chimären vermittelten sowohl eine Lipidvermischung als auch eine Öffnung kleiner wäßrigen Poren. Das Gleiche gilt für die F4F-Chimäre, wo die transmembranale Domäne durch die CD4-Domäne vertauscht worden ist. Wenn aber die transmembranale und zytoplasmatische Domänen durch CD4-Domänen substituiert waren, wurde die Öffnung kleiner wäßrigen Poren verhindert. Ob der Austausch nur der zytoplasmatischen Domäne des SeV durch die entsprechende Domäne des CD4 zum gleichen Effekt, d.h. Lipidvermischung, aber keine Porenöffnung, führt, muß noch untersucht werden.

4.6.3 Untersuchung der Vakziniavirus-infizierten Zellen

Um auszuschließen, daß Vakziniavirus-spezifische Produkte die Zell-Zell-Fusion induzieren konnten, wurden CV1-Zellen ohne der nachfolgenden Transfektion mit cDNA mit Vakziniavirus infiziert. An diese Zellen wurden doppelmarkierte RBC mittels WGA gebunden, und die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Selbst nach 3 h Inkubation bei 37°C wurde weder ein Übergang von R18- noch von Calcein-Molekülen registriert. Da WGA keinen inhibierenden Einfluß auf die Fusion hat (*Schroth-Diez et al., 1998*), kann man davon ausgehen, daß die oben beschriebene Zell-Zell-Fusion tatsächlich von Fwt oder entsprechenden Chimären vermittelt wurde. Auch der Befund, daß keine Fusion stattfand, wenn HN alleine exprimiert wurde, bestätigt diese Aussage.

5 Diskussion

5.1 Die 3D-Struktur des Sendaivirus-Fusionsproteins

Das Fusionsprotein des Sendaivirus (SeV-F) wurde erfolgreich aus nativen Viren isoliert. Es lag in der gespaltenen fusionskompetenten Form F1+F2 vor, und wies nach der Isolierung Fusions- und Hämolyseaktivität auf. Die Crosslinking Experimente ergaben, daß das SeV-F als Homotrimer organisiert ist. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Sechoy et al. (1987)*, die basierend auf dem Molekulargewicht von crosslinkten Proteinen eine tetramere Struktur des SeV-F berechnet haben. Untersuchungen an anderen Vertretern aus der Familie Paramyxoviridae wie das SV5, das HPIV3 (*Russel et al., 1994*), das Respiratory-Syncytial-Virus (HRSV) (*Calder et al., 2000*) sowie das NDV (*Chen et al., 2001*) ergaben jedoch, daß deren F-Proteine eine trimere Struktur haben. Da unser Ergebnis mit drei unabhängigen Untersuchungen übereinstimmt, ist es sehr wahrscheinlich, daß das SeV-F als Trimer vorliegt. Dies wurde auch während der Aufklärung der 3D-Struktur bestätigt (siehe "Ergebnisse").

Durch die Rekonstitution des F-Proteins unter Zugabe von 131 μM Ei-PC und 55.6 μM Rh-PE gelang es, eine homogene Probe von sich nicht überlappenden Molekülen mit unterschiedlicher Verteilung im Raum herzustellen. Damit wurde eine zwingende Voraussetzung für die Aufklärung der 3D-Struktur des F-Proteins geschaffen.

Die dreidimensionale Struktur der gesamten Ektodomäne des F-Glykoproteins des Sendaivirus wurde aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen einzelner Moleküle mit einer Auflösung von 16 Å rekonstruiert. Mit seinem Molekulargewicht von ca. 180 kDa ist es eines der kleinsten Moleküle, dessen 3D-Struktur bisher mit dieser Methode aufgeklärt wurde.

Die einzige bisher bekannte 3D-Struktur eines Paramyxovirus-F-Proteins ist die Röntgenkristallstruktur des NDV-F mit einer Auflösung von 3.3 Å (*Chen et al., 2001*). Der Vergleich der Primärsequenz dieses Proteins mit der des SeV-F zeigt eine Identität von

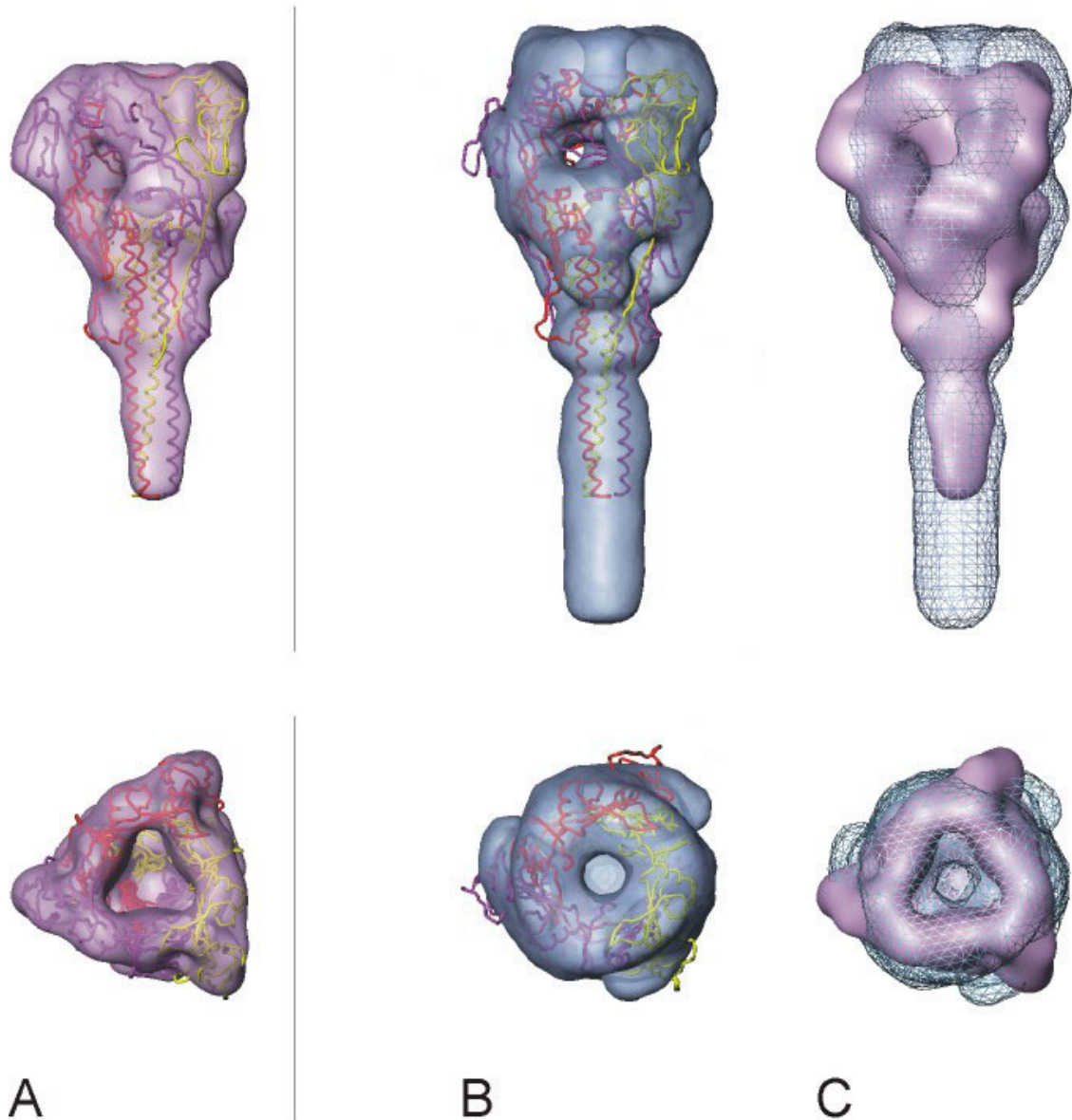


Abb. 5.1.1: Vergleich der 3D-Struktur des NDV-F und des SeV-F. Die obere Reihe zeigt die seitliche Ansicht der Proteine, die untere Reihe die Ansicht von oben. (A) Die Röntgenkristallstruktur des NDV-F mit einer verringerten Auflösung von 16 Å (fliederfarbene Darstellung). (B) Anpassung der Röntgenstruktur des NDV-F an die kryoelektronenmikroskopisch ermittelte 3D-Struktur des SeV-F (blaue Darstellung). (C) Anpassung der SeV-F-Struktur (Netzgitter) an die "low-pass"-gefilterte NDV-F-Struktur (fliederfarbene Darstellung). Weitere Details siehe Text. Mit freundlicher Genehmigung von K. Ludwig.

ca. 25 %, die ziemlich homogen über die gesamte Proteinsequenz verteilt ist. Wenn man in Betracht zieht, daß die Fusionsproteine des Semliki-Forest-Virus E1 (*Lescar et al., 2001*) und des Thick-Borne-Encephalitis-Virus E (*Rey et al., 1995*) trotz einer Sequenzidentität von nur 12 % eine sehr ähnliche Faltung aufweisen, kann man auch eine große Analogie zwischen den 3D-Strukturen des SeV-F und des NDV-F erwarten. Um einen direkten Vergleich zwischen

diesen Proteinen zu ziehen, wurde die hohe Auflösung der Röntgenkristalstruktur mittels eines scharfen Fourierfilters zurückgesetzt (Abb. 5.1.1 A).

Bei einer Auflösung von 16 Å weisen die Proteine abgesehen von den Unterschieden in der Stiellänge eine gute Übereinstimmung in ihrer äußeren Form und räumlichen Anordnung auf (siehe Abb. 4.1.6 und 5.2.1 A). Die Ansicht von oben zeigt bei den Proteinen eine dreieckige Ausrichtung des Moleküls und eine zentrale Öffnung. Auch die Lage und die Größe der radialen und axialen Kanäle im oberen Bereich der Proteine sind vergleichbar. Um eine exakte Aussage zu machen, inwieweit die 3D-Strukturen des SeV-F und des NDV-F sich decken, reicht jedoch ein rein äußerlicher Vergleich nicht aus. Daher wurde ein SITUS Software Paket, das Proteinstrukturen an Hand ihrer vertikalen dreidimensionalen Dichtekarte aneinander dockt, verwendet. Die Resultate einer Andock-Berechnung sind in Abbildung 5.1.1 B, C dargestellt und zeigen folgende Übereinstimmungen und Unterschiede in der Struktur der beiden Proteine auf: Ein gemeinsames charakteristisches Detail ist, daß die radialen Kanäle und die zentrale Höhlung von ähnlichen Fragmenten mit hoher Dichte umgeben sind. Auch die Lage dieser Fragmente stimmt überein. Bei beiden Proteinen bildet der Hals im unteren Bereich eine Verdickung. Die Strukturen weisen drei wesentliche Unterschiede auf. (i) Der Hals des SeV-F ist im oberen Bereich breiter als bei NDV-F (gut erkennbar auf der Abb. 5.2.1 C). (ii) Der axiale Kanal ist bei SeV-F durch eine Dreiarms-Brücke von den radialen Kanälen abgegrenzt (siehe auch Abb. 4.2.6 C, D). (iii) Die flügelähnlichen Ausbuchtungen sind im Uhrzeigersinn verschoben (Abb. 5.1.1 B und C, untere Reihe). Der kürzere Stiel des NDV-F basiert aber nicht auf einem Strukturunterschied zwischen den Proteinen. Das zur Virushülle hin proximale Ende des NDV-F-Proteins konnte aufgrund seiner hohen Flexibilität nicht aufgelöst werden und fehlt daher in der Röntgenstruktur (*Chen et al., 2001*). Außerdem fehlen in dieser Struktur Segmente, die in der Primärstruktur den AS 106-170 und AS 455-553 entsprechen.

Die Tatsache, daß die Proteinstrukturen trotz einiger Übereinstimmungen Unterschiede aufweisen, deutet auf verschiedene Konformationszustände der Proteine hin. Ein Grund für unterschiedliche Konformationszustände könnte im Ursprung dieser Proteine liegen. Für die Röntgenstrukturanalyse des NDV-F wurde das Vorläuferprotein F0 exprimiert. Im Falle des SeV-F kann man sicher sagen, daß es sich um ein gespaltenes Protein handelt. Aus früheren Untersuchungen an Paramyxoviren ist bekannt, daß nach der Spaltung des F0 zur F1+F2-Form eine Konformationsumwandlung stattfindet (*Hsu et al., 1981; Dutch et al., 2001*).

Mittels CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß das Vorläuferprotein des SeV-F und das gespaltene SeV-F Abweichungen in ihrer Konformation aufweisen (*Hsu et al., 1981*). Eine signifikante Änderung in der Antikörpererkennung wurde bei SV5-F nach der Spaltung des F0 in die fusionskompetente Form F1+F2 beobachtet (*Dutch et al., 2001*). Antikörper gegen die ‚heptad repeat‘-Sequenzen konnten diese Regionen nur beim ungespaltenen Protein erkennen. Daher kann man schlußfolgern, daß die von uns rekonstruierte 3D-Struktur ein gespaltenes F-Protein in der F1+F2-Form darstellt. Eine eindeutige Klassifizierung der Kristallstruktur des NDV-F ist leider nicht möglich. Obwohl zur Expression des F0 von NDV eine F-Mutante, die die Spaltungsstelle zwischen F1 und F2 nicht besitzt, und ein Expressionssystem, das nicht in der Lage ist das F0 zu spalten, verwendet wurde, war das auskristallisierte F-Protein proteolytisch gespalten. Die Autoren vermuten, daß die Röntgenstruktur einer Mischung aus F0 und gespaltenem F-Protein entspricht (*Chen et al., 2001*).

In einer früheren Arbeit von *Calder et al. (2000)* wurde von zwei unterschiedlichen Formen der F-Ektodomäne eines Paramyxovirus berichtet. Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von negativkontrastierten und getrockneten Proben von HRSV-F konnte eine "cone"- bzw. "lollipop"-Form identifiziert werden. Weiterführende Untersuchungen ergaben, daß das HRSV zwei Spaltungsstellen besitzt und erst durch die enzymatische Spaltung an beiden Stellen das F-Protein den fusionskompetenten Zustand erreicht. Es wird angenommen, daß das F-Protein nach der zweiten Spaltung von der "cone" zur "lollipop"-Form übergeht (*Gonzales-Reyes et al., 2001; Ruiz-Argello et al., 2002*). Weil das von uns verwendete SeV-F in der gespaltenen Form vorliegt, müßte es nach diesen Erkenntnissen die "lollipop"-Form aufweisen. Chen und Mitarbeiter nehmen an, daß das NDV-F dem "cone"-förmigen Zustand entspricht (*Chen et al., 2001*). Ein Vergleich der äußeren Form der beiden Proteine, die in der Abbildung 4.6.1 B und 5.1.1 A (oben) dargestellt sind, zeigt, daß der globuläre Teil des SeV-F tatsächlich etwas kugelförmig und der des NDV-F konusförmig ist.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen und des Befundes, daß das isolierte F-Protein Fusionsaktivität aufweist, stellt die von uns aufgeklärte 3D-Struktur des Sendaivirus-F-Proteins einen gespaltenen fusionskompetenten Zustand dar.

5.2 Das Fusionsprotein des Simianvirus 5

Die Struktur des antiparallelen "coiled-coil" eines Paramyxovirus wurde zum ersten Mal anhand von gentechnisch hergestellten Peptiden, die den "heptad repeat"-Sequenzen des Simianvirus 5 entsprechen, aufgeklärt (*Baker et al., 1999*). SV5 unterscheidet sich von den anderen Paramyxoviren auch dadurch, daß das exprimierte SV5-F in Abwesenheit des homotypischen HN eine Fusion induzieren kann. Das SV5 ist daher einer der interessantesten Vertreter der Paramyxoviren, und die Aufklärung der 3D-Struktur des SV5-F könnte neue Hinweise zur paramyxovirusvermittelten Fusion geben.

Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Isolierung des SV5-F unter Erhaltung der biologischen Proteinfunktion etabliert. Zur Solubilisierung der Virushülle wurde Triton X-100 verwendet, und die Membranproteine F und HN wurden mittels Säulenchromatographie voneinander getrennt (siehe Abschnitt 4.2). Das aus nativen Viren isolierte F-Protein des SV5 lag im fusionskompetenten Zustand vor, denn es konnte Hämolyse induzieren (Abb. 4.2.2). Damit wurde erstmals gezeigt, daß das SV5-F aus nativen Viren in Abwesenheit von HN Hämolyse induzieren kann. Diese Feststellung korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchungen an exprimierten SV5-F-Proteinen. Zur Induktion von Hämolyse war jedoch die Zugabe von WGA notwendig, das die Bindung der SV5-F-Virosomen an die Erythrozyten gewährleistet.

Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Proben zeigten, daß das SV5-F-Protein eine dem SeV-F ähnliche Form hat. Es besteht aus einem globulären Kopf und einem dünnen Stiel. An manchen Proteinen ist sogar zu erkennen, daß sie im globulären Teil eine Höhlung aufweisen. Nähere Aussagen können natürlich erst nach der Aufklärung der 3D-Struktur gemacht werden. Aus den Aufnahmen ist auch ersichtlich, daß diese Präparation für die Rekonstruktion der 3D-Struktur mittels Kryoelektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse sehr gut geeignet ist. Die Arbeiten zur Aufklärung der 3D-Struktur des SV5-F werden demnächst begonnen.

5.3 pH- und Temperaturabhängigkeit der Fusionsaktivität von Paramyxoviren

Für das Verständnis der paramyxovirusvermittelten Membranfusion ist die Kenntnis der 3D-Struktur des Fusionsproteins im fusionsaktiven Zustand notwendig. Der Auslöser für die Konformationsumwandlung des F-Proteins vom fusionskompetenten zum fusionsaktiven Zustand ist jedoch bislang nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Fusionsverhalten des Sendaivirus und des Simianvirus 5 bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen untersucht, um physikochemische Bedingungen herauszufinden, bei denen eine Strukturänderung des isolierten F-Proteins induziert werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Änderung des pH-Wertes nur einen geringen Einfluß auf die Fusionsaktivität des SeV hat (Abb. 4.3.1 und 4.3.2). In der Literatur gibt es keine einheitlichen Aussagen über die pH-Abhängigkeit der SeV-vermittelten Fusion. Hsu und Mitarbeiter haben eine Erhöhung der Fusionsaktivität bei basischem pH gefunden, aber Klappe und Mitarbeiter ermittelten bei saurem pH einen Anstieg der Fusion (*Hsu et al., 1982; Klappe et al., 1986*). In der vorliegenden Arbeit wurde eine leichte Erniedrigung des Fusionsausmasses bei basischem pH und eine leichte Erhöhung bei saurem pH gefunden. Trotz des beobachteten Anstiegs des Fusionsausmasses bei saurem pH-Wert kann man feststellen, daß diese Bedingungen keine optimalen Konditionen für die SeV-Ghosts-Fusion bieten, da die Anfangsgeschwindigkeit der Fusion bei saurem pH niedriger als bei neutralem pH ist und die Fusionskurve bei saurem pH eine "lag"-Zeit aufweist (Abb. 4.3.1). Die „lag“-Zeit kennzeichnet die Zeitdauer zwischen dem Start der Fusionsmessung und der ersten meßbaren Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Während dieser Zeit finden wahrscheinlich Schritte statt, die zur Initiierung der Fusion notwendig sind, wie die Wechselwirkung zwischen HN und F, Akkumulation der Membranproteine an den Kontaktseiten mit dem Target sowie die Konformationsumwandlung des F-Proteins. Aus diesen Messungen können keine direktenSchlußfolgerungen über den Ablauf oben genannter Prozesse gewonnen werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß die Strukturumwandlung des SeV-F beim saurem pH-Wert zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet oder langsamer verläuft als bei neutralem pH-Wert, weil die Membranfusion bei saurem pH-Wert später als bei neutralem zu beobachten ist.

Im Falle des SV5 wurde eine fast zweifache Zunahme der Fusionsaktivität bei einem pH-Wert von 5.0 gefunden (Abb. 4.3.2). Es ist jedoch unklar, ob der niedrige pH-Wert die Konformationsumwandlung des SV5-F beeinflusst. Die Tatsache, daß durch eine Inkubation des SV5 in Abwesenheit von Target bei saurem pH über längere Zeit (6 h) die Fusionsaktivität des SV5 nicht beeinträchtigt wurde (siehe Abschnitt 4.2), deutet eher darauf hin, daß das saure Milieu anders als beim Influenzavirus-HA keine Konformationsänderung des F-Proteins auslöst. Bei Paramyxoviren könnte jedoch das Vorhandensein eines Targets für die Konformationsumwandlung des F-Proteins notwendig sein. Daher müssen zukünftige Strukturuntersuchungen klären, ob ein niedriger pH-Wert einen direkten Einfluß auf die F-Protein-Strukturänderung hat.

Die Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Fusionsaktivität des SeV und des SV5 zeigen, daß mit der Erhöhung der Temperatur das Ausmaß sowie die Anfangsgeschwindigkeit der Fusion ansteigt und die "lag"-Zeit abnimmt (Abb. 4.3.3 und 4.3.4). Dies ist wahrscheinlich auf eine erhöhte laterale Beweglichkeit der beiden membranständigen Proteine F und HN zurückzuführen, denn es existiert eine direkte Korrelation zwischen der lateralen Mobilität der Proteine und der Fusionsaktivität (*Henis et al., 1989*). Es wurde festgestellt, daß durch eine Immobilisierung der Proteine HN und F die SeV-Fusion inhibiert wird. Daher ist die laterale Beweglichkeit der Membranproteine essentiell für die Fusion (*Henis et al., 1989*). Außerdem hat die Erhöhung der Temperatur auch einen Einfluß auf die Konformationsumwandlung des F-Proteins. Das Erwärmen von SeV führt auch in Abwesenheit von Target zur Strukturänderung des F-Proteins, wodurch das F-Protein zugänglich für Proteinase K wird (*Wharton et al., 2000*). Es konnte für das HA von Influenzavirus A gezeigt werden, daß aufgrund der Metastabilität der nativen Konformation des HA nicht nur durch Senkung des pH-Wertes, sondern auch durch Erwärmung bei neutralem pH-Wert die fusionsaktive Konformation erzielt werden kann (*Wharton et al., 1986, Carr et al., 1997*). Falls diese Metastabilität ein typisches Charakteristikum der Fusionsproteine von Hüllviren ist, kann man schlußfolgern, daß die Erhöhung der Temperatur einen direkten Einfluß auf die Konformationsänderung des F-Proteins hat. Durch Erwärmung könnte die Wechselwirkung zwischen den F2- und F1-Untereinheit aufgelockert werden, und dies könnte zur Freilegung der hydrophoben Fusionspeptide aus dem Innern des F-Trimers und damit zur Fusion führen. Man nimmt an, daß eine Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten F1 und F2 zur Stabilisierung des F-Proteins beiträgt. Punktmutationen dieser

Untereinheiten führen zur Destabilisierung des F-Proteins, und entsprechende F-Mutanten sind in der Lage in Abwesenheit von HN eine Membranfusion zu vermitteln (*Ito et al., 1997; Ito et al., 2000; Tsurudome et al., 2001*). Es ist jedoch zu beachten, daß bei den genannten Versuchen entweder das HN-Protein oder eine Targetmembran vorhanden war. Die Experimente zur Strukturänderung des F-Proteins in Abwesenheit von Target wurden an nativen Viren, d.h. in Anwesenheit von HN, durchgeführt (*Wharton et al., 2000*). Die Fusionsaktivität des F-Proteins in Abwesenheit von HN wurde anhand von F-proteinvermittelten Zell-Zell-Fusion überprüft (*Ito et al., 1997; Ito et al., 2000; Tsurudome et al., 2001*).

Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen am isolierten SeV-F- bzw. SV5-F-Protein. Es ist wichtig zu erforschen, ob eine Erhöhung der Temperatur oder eine Erniedrigung des pH-Wertes ausreichend für die Strukturänderung eines isolierten F-Proteins ist oder andere Faktoren wie z. B. das Vorhandensein von Target oder des HN-Proteins eine entscheidende Rolle dabei spielen. Erst dann könnten ausreichende Bedingungen zum Auslösen der Konformationsänderung des isolierten F-Proteins vom fusionskompetenten zum fusionsaktiven Zustand geschaffen werden. Außerdem müssen natürlich optimale Bedingungen für die Strukturaufklärung herausgefiltert werden, denn eine zu lange Inkubationszeit oder eine zu hohe Inkubationstemperatur könnte zur Inaktivierung des F-Proteins führen.

5.4 Wechselwirkung von LPC mit Myxoviren

5.4.1 Einfluß von LPC auf die Fusion von Sendai- und Influenzaviren

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß Lysophosphatidylcholin, Myristoyl, (LPC) die Fusion von Sendaviren mit Erythrozytenghosts hemmt. Der inhibierende Einfluß von LPC war abhängig von der Menge der zugegebenen Lysolipide. In Anwesenheit von 2 mol% LPC bezogen auf endogene Virus- und Ghostlipide (3.4 µM) wurde

die Fusion von SeV um 20 % gehemmt, und durch 10 mol% LPC (17 μ M Endkonzentration) um 80 % (Abb. 4.4.2). Der inhibierende Einfluß von LPC auf die Membranfusion wurde ebenso bei Influenzavirus-vermittelter Fusion festgestellt. Durch Zugabe von 10 mol% LPC bezogen auf die endogenen Lipide von Ghost und Virus (13 μ M Endkonzentration) wurde die Influenzavirus-Ghost-Fusion jedoch nur um ca. 20 % erniedrigt (4.5.1 B). Es ist unwahrscheinlich, daß dieser Unterschied des LPC-Einflusses durch die unterschiedlichen Endkonzentrationen hervorgerufen wird, denn bezogen auf das gesamte System (Ghost und Virus) wurde immer die gleiche Menge von LPC eingesetzt. Die unterschiedliche Hemmung des Fusionsausmasses von Influenza- bzw. Sendaiviren durch LPC basiert daher eher auf den Eigenschaften des jeweiligen Fusionssystems. Ein Vergleich der Ergebnisse von früheren Arbeiten zeigt auch, daß die Sensitivität verschiedener Systeme hinsichtlich des inhibierenden Einflusses von Lysolipiden auf die Fusion unterschiedlich ist. Während durch 10 mol% LPC, Palmitoyl, die Fusion von HA-exprimierenden Zellen mit Erythrozyten um ca. 70 % gehemmt wird (*Chernomordik et al., 1997*), wird die GTP-abhängige Mikrosom-Mikrosom-Fusion nur um 50 % inhibiert (*Chernomordik et al., 1993*).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß sich Lysolipide zum "Einfangen" von Intermediaten der SeV-F-vermittelten Fusion besonders eignen. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt wie und im welchem Fusionsintermediat die Lysolipide die Membranfusion hemmen. Wie bereits in der Einführung erwähnt, existieren zwei gegensätzliche Theorien. Chernomordik und Mitarbeiter vertreten die Ansicht, daß die Lysolipide durch ihren Einbau in die äußere Monolayer die Ausbildung von Stalks hemmen (*Chernomordik et al., 1987; Kozlov et al., 1989; Chernomordik et al., 1995; Chernomordik et al., 1997; Chernomordik et al., 1999*). Günther-Ausborn und Mitarbeiter vermuten dagegen, daß eine direkte Interaktion von LPC mit der HA-Ektodomäne die Wechselwirkung des Fusionspeptides mit der Targetmembran verhindert und damit Lysolipide die Membranfusion in einem früheren Schritt als der Ausbildung von Stalks hemmen (*Günther-Ausborn et al. 1995*).

5.4.2 LPC wechselwirkt mit der Virushülle und nicht mit der HA-Ektodomäne

Um die Interaktion von LPC mit der HA-Ektodomäne bzw. mit der Virushülle

aufzulösen, wurde spinmarkiertes LPC verwendet. Beim spinmarkierten Derivat ist die für LPC typische „umgekehrte Kegel“-Form durch die Nitroxidgruppe an der hydrophoben Ende der C18-Kette etwas gestört. Jedoch konnten wir zeigen, daß die Inhibierung von Influenzavirus-Fusion durch spinmarkierte LPC vergleichbar mit der des nicht markierten LPC ist (siehe Abb. 4.5.2). Das SL-LPC stellt daher ein geeignetes Analogon dar.

Die Wechselwirkung von SL-LPC mit BHA war pH-abhängig. Bei neutralem pH-Wert wurde eine Wechselwirkung von SL-LPC mit BHA festgestellt, obwohl bei HA unter diesen Bedingungen das hydrophobe Fusionspeptid nicht aus der Ektodomäne herausragt. Wenn der pH-Wert auf 5.0 gesenkt wurde, erhöhte sich die Bindung von SL-LPC zu BHA. Dieses Ergebnis kann durch die Exponierung hydrophober Sequenzen nach der Konformationsänderung der HA-Ektodomäne erklärt werden. Dies wurde auch durch den Befund, daß die erhöhte Bindung von SL-LPC bei saurem pH-Wert auch nach einer Reneutralisierung konstant bleibt, unterstützt. Es ist bekannt, daß die Konformationsänderung des HA und die damit verbundene Exponierung des Fusionspeptides irreversibel ist (*Korte et al., 1999; Stegmann et al., 1986*). Aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität bietet das Fusionspeptid am N-terminalen Ende des HA2 wahrscheinlich nach der Exponierung neue Bindungsstellen für SL-LPC. Diese Bindung der Lysolipidanaloga an die HA-Ektodomäne spiegelt sich in einer erhöhten Immobilisierung von SL-LPC wider. Die Wechselwirkung von SL-LPC mit BHA war jedoch im Vergleich zur Wechselwirkung von SL-LPC mit dem fettsäure- und lipidbindenden Protein BSA viel schwächer. Um die Wechselwirkung von SL-LPC mit der HA-Ektodomäne aufzulösen, musste in der Tat ein viel höheres Mengenverhältnis von BHA zu SL-LPC verwendet werden.

In Anwesenheit von Influenzavirus war SL-LPC fast ausschließlich in die Virusmembran eingebaut. Bei einer Konzentration von 10 mol% der endogenen Lipide befanden sich weniger als 4 % der zugegebenen SL-LPC in der wässrigen Umgebung. Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe Affinität der Lysolipidanaloga zur Membran hin. Tatsächlich entsprechen die gemessenen Spektren typische Membranspektren. Es gab keine Hinweise darauf, daß eine signifikante Menge an SL-LPC sowohl bei neutralem als auch bei saurem pH-Wert an die HA-Ektodomäne des intakten Virus bindet. Die Spektrumkomponente, die bei der Bindung von SL-LPC an BHA aufgenommen wurde, war bei den Spektren mit intakten Viren nicht vorhanden. Desweiteren war das SL-LPC-Spektrum in Anwesenheit von intakten Viren identisch mit dem Spektrum in Anwesenheit von Viren, bei denen die HA-

Ektodomäne durch eine Bromelainbehandlung abgespalten waren. Daher ist zu vermuten, daß die hohe Anzahl der Bindungsstellen der Virushülle und deren Affinität mit den Bindungsstellen der HA-Ektodomäne konkurriert und damit eine signifikante Bindung der Lysolipidanaloga zur Ektodomäne unterbindet. Zusätzliche Unterstützung für diese Vermutung gaben Untersuchungen der Wechselwirkung von BHA mit SL-LPC markierten Liposomen. Es wurde weder eine Interaktion noch eine Extraktion der Analoga durch BHA aus der Liposomenmembran gefunden. Im Gegensatz dazu war BSA in der Lage die Lysolipide aus der Liposomenmembran vollständig zu extrahieren. Daraus schlußfolgern wir, daß die immobilisierte Komponente in den Membranspektren von SL-LPC durch die in die Membran eingebauten und nicht durch die an die HA-Ektodomäne gebundenen SL-LPC hervorgerufen wurde.

Zusammenfassend kann man sagen, daß unter Bedingungen, bei denen die Fusionsinhibierung festgestellt wurde, eine starke Wechselwirkung der SL-LPC mit dem Lipidbilayer der Virushülle und keine Bindung der spinmarkierten Analoga an die HA-Ektodomäne gefunden wurde. Diese Ergebnisse liefern ein überzeugendes Indiz dafür, daß die Lysolipidhemmung der Membranfusion durch in die Lipidbilayer eingebauten Lysolipide hervorgerufen wird, so wie in der Stalk-Hypothese angenommen wurde (*Chernomordik et al., 1999*). Unsere Daten sprechen gegen die Hypothese der Wechselwirkung von Lysolipiden mit der HA-Ektodomäne, wodurch das Eintauchen des Fusionspeptides in die Targetmembran verhindert wird (*Günther-Ausborn et al., 1995*). Dementsprechend hemmen die Lysolipide die Membranfusion in einem späten Schritt, und nicht am Anfang der Fusion. Obwohl diese Daten für eine Inhibierung der Fusion durch membrangebundene Lysolipide sprechen, können sie eine Wechselwirkung des Fusionspeptides mit Lysolipiden nach dem Eintauchen dieser Sequenz in die Membran nicht widerlegen. Diese Wechselwirkung würde aber zu einer lokalen Anreicherung von Lysolipiden führen, die eine Bildung von Strukturen mit einer negativen Krümmung verhindern würde. In diesem Falle würde die Ausbildung der Stalks mit einem Hemifusionsintermediat aufgrund der lokalen Anreicherung von Lysolipiden energetisch noch ungünstiger.

5.5 Die Rolle der transmembranalen und zytoplasmatischen Domäne des Sendaivirus-F bei der Membranfusion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fusionsaktivität unterschiedlicher Chimären des SeV-F mit transmembranalen (TM) und/oder zytoplasmatischen (CT) Domänen des Influenzavirus-HA bzw. des membranständigen Proteins CD4 untersucht. Der Wildtyp des SeV-F bzw. die F-Chimären wurden mittels eines transienten T7-RNA-Polymerase Vakziniavirus Expressionssystems in CV1-Zellen exprimiert. Für eine erfolgreiche proteinvermittelte Zell-Zell-Fusion war die Co-Expression des Sendaivirus-HN notwendig (mehr dazu im nächsten Abschnitt). Zur Untersuchung der Fusionsaktivität der exprimierten Proteine wurden fluoreszenzmarkierte humane Erythrozyten verwendet. Um die einzelnen Fusionsintermediate die Lipidvermischung und die Bildung kleiner wäßriger Poren aufzulösen, waren die Targetzellen mit dem Membranmarker R18 und mit dem Zytoplasmamarker Calcein markiert.

Alle F-Chimären waren in der Lage, eine Membranfusion (Übergang von R18) zwischen den Zellen zu vermitteln. Die Bildung kleiner wäßriger Poren (Calcein-Übergang) konnten alle Chimären außer dem F44 vermitteln. Da die Fusionsausmaße der F-HA-Chimären nur etwas niedriger waren als bei Fwt, kann man schlußfolgern, daß die Substitution der TM und/oder CT Domäne des SeV-F durch die äquivalente Domäne eines viralen Proteins mit der gleichen Funktion des Influenzavirus-HA, die Fusionsaktivität des SeV-F kaum beeinflußt. Ähnliche Resultate wurden auch in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe erzielt. *Schroth-Diez et al., 1998* und *Kozerski et al., 2000* fanden, daß die Substitution der TM und/oder CT Domäne des Influenzavirus-HA durch SeV-F-Domänen keinen Einfluß auf die Fusionsaktivität des HA hatte. Die unterschiedlichen HA-F-Chimären waren in der Lage, eine vollständige Membranfusion, d.h. nicht nur Lipidvermischung und Bildung kleiner wäßriger Poren sondern auch eine Vergrößerung der Fusionsporen zu vermitteln. Auch andere Autoren fanden, daß HA-Chimären mit TM und CT Domäne des G-Proteins des Vesikular-Stomatites-Virus, des gC-Glycoproteins des Herpes-Simplex-Virus 1 oder des Hüllproteins des Rous-Sarkoma-Virus gleiche biologische Funktionen wie das Wildtyp des HA zeigten (*Roth et al., 1986; Dong et al., 1992*).

Im Falle der F-Chimären mit der TM Domäne eines nichtviralen und nichtfusiogenen

membranständigen Proteins CD4 wurden gleiche Ergebnisse gefunden. Der F4F-Chimäre vermittelte die Lipidvermischung sowie die Öffnung kleiner wäßriger Poren. Diese Daten stimmen mit früheren Untersuchungen an Vertretern anderer Virusfamilie überein (*Melikyan et al., 1999; Kozerski et al., 2000*). Die Substitution der TM Domäne des HA durch die äquivalente Domäne des CD4 (*Kozerski et al., 2000*) bzw. eines anderen nichtviralen Membranproteins, Poly-Immunglobulinrezeptor des Kaninchens, hatte keinen Einfluß auf die Fusionaktivität des HA (*Melikyan et al., 1999*). Obwohl die TM Domäne des SeV-F innerhalb der Paramyxovirusgattung hoch konserviert ist (siehe dazu *Schroth-Diez et al., 2000*), konnte keine nachweisbare Beeinflussung der biologische Funktion des SeV-F durch die Substitution dieser Domäne durch die TM Domäne anderer membranständigen Proteine nicht gefunden werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, daß die Eigenschaften der TM Domänen, wie z.B. die Hydrophobizität oder die Länge, aufgrund ihrer Funktion als Proteinanker sehr ähnlich sind. Die durchgehenden TM Domänen unterschiedlicher Proteine sind mehr oder weniger hydrophob, und müssen eine bestimmte Mindestlänge haben, um ein Lipidbilayer durchspannen zu können. Eine Verkürzung der TM Domäne hingegen beeinflusst die Funktion eines Fusionsproteins (*Armstrong et al., 2000*). Es konnte festgestellt werden, daß die TM Domäne des Influenza-HA eine Mindestlänge von 17 AS haben muß, damit das HA eine vollständige Fusion vermitteln kann. Falls die TM Domäne auf 15 AS oder weniger verkürzt wurde, konnte nur eine Hemifusion beobachtet werden (*Armstrong et al., 2000*).

Nur bei der Chimäre F44, deren TM und CT Domäne durch die äquivalenten Domänen des CD4 ersetzt sind, wurde trotz einer Lipidvermischung (Übergang von R18) keine Bildung kleiner wäßriger Poren (Übergang von Calcein-Molekülen) gefunden. Der Übergang der Membranmarker deutet darauf hin, daß die TM und CT Domänen des CD4 von SeV-F toleriert wird und zumindest eine Strukturumwandlung des Proteins stattgefunden hat. Es ist jedoch unklar, ob die Hemifusion auf die Wechselwirkung der TM und CT Domänen während der Membranfusion oder allein auf die Substitution der CT Domäne zurückzuführen ist. Um diese Frage zu klären, müßte eine F-Chimäre mit der CT Domäne des CD4 hergestellt und überprüft werden. Allerdings ist bekannt, daß eine Modifikation der CT Domäne des F-Proteins bei Paramyxoviren die späten Fusionsschritte beeinflusst. Die Verkürzung der CT Sequenz des F-Proteins führte bei SV 5 und NDV zur Inhibierung der Erweiterung der Fusionsporen bzw. der Synzytiumformation (*Bagai und Lamb, 1996; Dutch und Lamb, 2001; Sergel und Morrison, 1995*). Auch wenn die CT Domäne des CD4 kürzer als die

entsprechende SeV-F-Domäne ist, trifft diese Feststellung auf die F44-Chimäre nicht zu, denn die FFH-Chimäre zeigte die gleiche Fusionsaktivität wie das Fwt, obwohl die CT Domäne des HA fast vierfach kürzer als die vom SeV-F ist.

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß die HA-Chimäre mit TM und CT Domänen des CD4 (HA-CD4-CD4) zwar die Porenbildung, aber nicht die Porenerweiterung induzieren kann (*Kozerski et al., 2000*). Die HA-Chimäre mit der CD4-Zytoplasmadomäne (HA-HA-CD4) kann ebenso die Lipidvermischung und die Öffnung kleiner wäßriger Poren vermitteln, aber nicht die Erweiterung der Fusionspore (*Kozerski et al., 2000*). Die Autoren führten diesen Effekt auf die Hydrophobizität der Aminosäuresequenz der CD4-CT-Domäne zurück. Die Aminosäuresequenz der CD4-CT-Domäne, die unmittelbar der TM Domäne folgt, ist stark hydrophil (Abb. 5.5.1). Im Gegensatz dazu sind die entsprechenden Sequenzen der meisten viralen Fusionsproteinen stark hydrophob (Abb. 5.5.1). Basierend auf dem „elastic-coupling“ Model für HA (*Melikyan et al., 1995*) wurde postuliert, daß eine Verringerung der Hydrophobizität das teilweise Eintauchen der CT Domäne in die Membran erschwert. Dieses Eintauchen erfolgt während der Verschiebung des HA von der vertikalen zur Schräglage und eine geringe Hydrophobizität könnte diese Positionsverschiebung der TM Domäne des HA verhindern. Dies würde zur Unterbindung einer vollständigen Fusion führen (*Kozerski et al., 2000*). Diese Hypothese könnte auch auf die hier untersuchte Chimäre F44 zutreffen.

Es ist jedoch hervorzuheben, daß die F44-vermittelte Fusion in einem früheren Schritt, der Bildung kleiner wäßriger Poren, eingefroren war. Es besteht die Möglichkeit, daß dieser Effekt auf der Wechselwirkung zwischen SeV-F und SeV-HN, die im Unterschied zur HA-vermittelten Fusion für eine SeV-F-vermittelte Zell-Zell-Fusion notwendig ist, basiert. Tsurudome und Mitarbeiter konnten feststellen, daß das F-Protein des Simianvirus 41, dessen HR1-Sequenz (HRC) und TM/CT-Domänen substituiert sind, unterschiedlich starke Fusionsaktivität in Anwesenheit von homo- bzw. heterotypischen HN aufweist (*Tsurudome et al., 1998*). Es wird vermutet, daß eine spezifische Interaktion der F-CT-Domäne der Paramyxoviren mit HN eine essentielle Rolle bei der Fusion spielt (*Tsurudome et al., 1998; Ito et al., 2000*). Es ist aber immer noch unklar, wie dieser Mechanismus funktioniert.

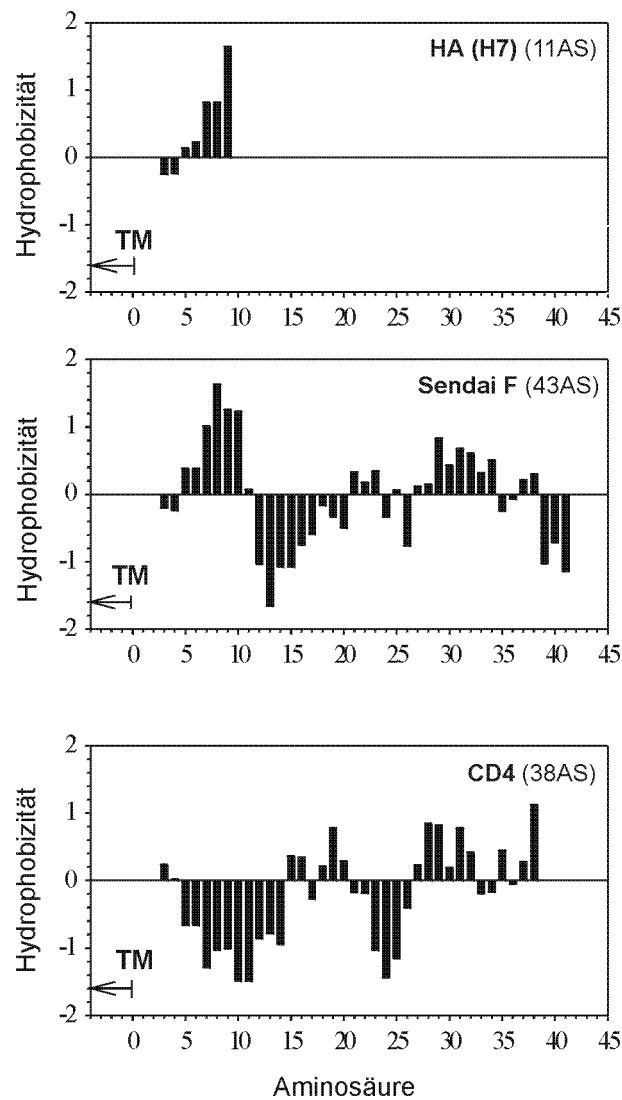


Abb. 5.5.1 Hydrophobizitätsplots der zytoplasmatischen Domänen des Influenza-A-Virus-HA, des Sendavirus-F und des CD4-Proteins. Mit freundlicher Genehmigung von Ch. Kozerski.

Um eine endgültige Aussage über die Wirkungsweise der F44-Chimäre zu machen, müßte, wie schon erwähnt, die Fusionsaktivität der F-Chimäre mit der CD4-CT-Domäne untersucht werden. Es muß noch geklärt werden, inwieweit die Co-Expression von HN die Oberflächenexpression von Fwt und dessen Chimären beeinflusst. Aufgrund der fehlenden Antikörper wurden diese Untersuchungen noch nicht durchgeführt. Aus dem unterschiedlich starken Ausmaß der Bindung von Targetzellen ist jedoch ersichtlich, daß die Oberflächendichte des HN-Proteins in den unterschiedlichen Expressionsansätzen entweder mit Fwt oder den einzelnen F-Chimären nicht gleich war. Demzufolge ist es möglich, daß die Oberflächenexpression des Fwt bzw. der F-Chimären durch die Co-Expression von HN

beeinflußt wird.

Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen der F-vermittelten Zell-Zell-Fusion, wie z.B. Erweiterung der Fusionspore und Ermittlung der Porengröße unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Dextran mit unterschiedlichen Molekulargewichten.

5.6 Die Funktion der Hämagglutinin-Neuraminidase bei der F-proteinvermittelten Membranfusion

Eine der interessanten Fragestellungen im Hinblick auf Paramyxoviren ist, welche Rolle das HN bei der Membranfusion spielt. Die Antwort auf diese Frage könnte auch Hinweise auf den Trigger und den Mechanismus der Fusion von Paramyxoviren mit der Targetmembran geben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß das HN für die SeV-F-vermittelte Fusion nicht notwendig ist, wenn Rezeptoren oder Agenzien für eine Bindung vorhanden sind. Virosomen mit dem SeV-F-Protein konnten in Abwesenheit von HN mit HepG2-Zellen fusionieren. Da das SeV-F Kohlenhydrateinheiten mit endständiger Galaktose besitzt, wird es vom Asialoglykoproteinrezeptor der HepG2-Zelle erkannt und gebunden (*Yoshima et al.; 1981, Markwell et al., 1985*). Das isolierte SeV-F war auch in der Lage, Hämolyse hervorzurufen, wenn in der Virosomen-Erythrozyten-Suspension WGA vorhanden war. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen am isolierten SeV-F oder an SeV-Mutanten ohne HN überein (*Tomasi und Loyter, 1981; Markwell et al., 1985; Bagai et al., 1993 und Leyrer et al., 1998*).

Für die SeV-F-vermittelte Zell-Zell-Fusion war jedoch die Co-Expression von HN notwendig. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die maximale Fusion erreicht wird, wenn die CV1-Zellen mit cDNA von Fwt und HN in einem Verhältnis von 1:2 (w/w) transfiziert werden. Dies zeigt, daß für die F-vermittelte Fusion nicht nur das Vorhandensein der homotypischen F und HN notwendig ist, sondern auch eine bestimmte Stöchiometrie zwischen den Proteinen eingehalten werden muß. Es ist bekannt, daß das Fusionsprotein nicht

nur des Sendaivirus sondern auch anderer Paramyxoviren wie HPIV2, HPIV3, NDV, SV41 und BPIV3 für eine Zell-Zell-Fusion die Co-Expression der homotypischen HN benötigen (Hu et al., 1992; Ebata et al., 1991; Tsurudome et al., 1995; Moscona und Peluso, 1991; Sakai und Shibuta, 1989). Eine Ausnahme bilden SV5, Stamm W3A, und Measlesvirus. Bei diesen Viren ist die Expression des F-Proteins ausreichend für eine Zell-Zell-Fusion (Horvath et al., 1992; Alkhatib et al., 1990). Der Mechanismus der Wechselwirkung zwischen F und HN während der Fusion ist dabei unklar. Man nimmt an, daß eine Strukturänderung des HN nach der Bindung an Zellrezeptoren stattfindet und dies zur einen Wechselwirkung mit dem F-Protein führt. Diese Wechselwirkung induziert wiederum eine Konformationsumwandlung des F-Proteins und damit die Membranfusion (Dallocchio et al., 1994; Stone-Hulslander und Morrison, 1997; Hu et al., 1992).

Eine andere Hypothese besagt, daß das HN nur für die Akkumulation von F-Proteinen an der Kontaktseite mit der Targetmembran verantwortlich ist (Bagai et al., 1993). Bei Sendaiviren wurde eine direkte Korrelation zwischen der lateralen Beweglichkeit der Membranproteine sowie deren Ansammlung an der Zell-Zell-Kontaktseite mit der Fähigkeit der Proteine, eine Fusion zu induzieren, gefunden (Henis et al., 1989; Aroeti und Henis, 1991). In einem nativen Virus sind die Membranproteine sehr dicht gepackt, und auch in den SeV-F-Virosomen stehen die Proteine eng aneinander. Im Gegensatz dazu ist die Dichte der exprimierten F-Proteine geringer als bei Viren oder Virosomen. Ein anderes Argument für die letzt genannte Funktion des HN liefert die Tatsache, daß SeV-F in Abwesenheit von HN eine geringere Fusionsaktivität zeigt. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in früheren Untersuchungen wurde eine verringerte Hämolyse- und Fusionsaktivität des isolierten SeV-F festgestellt (Tomasi und Loyter, 1981; Bagai et al., 1993). Wenn jedoch HN in den F-Virosomen ebenfalls rekonstituiert wurde, war die Anfangsgeschwindigkeit der Fusion der Virosomen mit HepG2-Zellen um das Zwei- bis Dreifache höher (Bagai et al., 1993). Die F-HN-Virosomen induzierten auch eine höhere Hämolyse als die F-Virosomen (Bagai et al., 1993). Auch im Falle des exprimierten SV5-F, das ohne HN eine Zellfusion induzieren kann, wurde eine Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit der Fusion durch die Co-Expression von HN festgestellt (Bagai und Lamb, 1997; Dutch et al., 1998). Es ist möglich, daß die Konformationsumwandlung des F-Proteins durch eine Wechselwirkung der Proteine untereinander und/oder mit einem Rezeptor bzw. mit der Targetmembran ausgelöst wird. Dabei könnte das HN-Protein, das auch die Bindung zum Target vermittelt, eine schnellere

und effektivere Akkumulation des F-Proteins an der Fusionsstelle sowie eine kürzere Distanz zur Targetmembran und so eine schnellere Strukturumwandlung des F-Proteins bewirken.

Der genauere Mechanismus der Wechselwirkung zwischen HN- und F-Proteinen ist unbekannt. Es gibt Hinweise, daß für die fusionfördernde Wechselwirkung die globulären Kopfdomänen des HN- und des F-Proteins eine wichtige Rolle spielen (*Bousse et al., 1995; Tsurudome et al., 1995; Tanabayashi und Compans, 1996*). Die 3D-Struktur der Kopfdomäne des NDV-HN-Proteins wurde röntgenkristallographisch ermittelt (*Crennell et al., 2000*). Diese Domäne des dimeren HN-Proteins stellt eine hantelförmige Struktur, die parallel zur Membran gerichtet ist, dar. Die Länge des Proteinstiels, der die Kopfdomäne mit der Transmembrandomäne verbindet ist jedoch nicht bekannt, weil die 123 AS am N-terminalen Ende des kristallisierten Proteinfragments fehlten. Wenn man jedoch in Betracht zieht, daß die Transmembrandomäne den AS von 27 bis 48 entsprechen (SWISS-PROT Datenbank: P12554) und die Kopfdomäne ab AS 124 beginnt (*Crennell et al., 2000*), ist die Stielregion ca. 75 AS lang und würde eine Länge von etwa 130 Å haben¹. Mit dieser Stiellänge würde sich die Kopfdomäne im gleichen Abstand von der Virushülle befinden, wie die Kopfdomäne des F-Proteins. Auch wenn der Stiel etwas kürzer ist, würde aufgrund der großen Kopfdomäne des HN-Proteins die Wechselwirkung zwischen den Kopfdomänen der beiden Proteine nicht unterbrochen sein. Damit unterstützt diese Berechnung die Befunde, daß eine solche Wechselwirkung zur Förderung der F-proteinvermittelten Fusion beiträgt (*Bousse et al., 1995; Tsurudome et al., 1995; Tanabayashi und Compans, 1996*). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Veränderung des HN-Protein-Stiels zur Inhibierung der Fusion führt. Nach dem die Stielregion des NDV-HN-Proteins um 9 AS verkürzt wurde, wies das HN-Protein keine fusionfördernde Aktivität auf, obwohl es die Bindung an Rezeptoren vermitteln konnte (*Sergel et al., 1993*). Wenn man das Ausmaß des globulären Kopfs des HN-Proteins bedenkt, ist es schwer vorzustellen, wie der Stiel mit dem F-Protein wechselwirken kann. Eine andere Erklärung für diese Befunde könnte sein, daß sich durch die Verkürzung des Stiels die Position der Kopfdomäne so verändert wird, daß die für die Fusionförderung notwendige Wechselwirkung zwischen den Proteinen unterbrochen wird. Außerdem gibt es Vermutungen, daß eine Wechselwirkung zwischen den TM und/oder CT Domänen der F- und

¹ Nach einer Sekundärstruktur-Vorhersage mittels PREDATOR (http://www.embl-heidelberg.de/predator/predator_info.html) hat der Stiel eine Disposition zur helikalen Struktur. Unter Annahme, daß der Stiel als eine Helix organisiert und 1.7 Å/AS ist, konnte eine maximale Länge von ca. 130 Å berechnet werden.

HN-Proteine existiert und sie nicht nur den Transport der Proteine, sondern auch die Fusion beeinflusst (*Tong und Compans, 1999; Stone-Hulslander und Morrison, 1997; Bousse et al., 1994*). Wenn solche Wechselwirkung für die Förderung der Fusion notwendig ist, implizieren unsere Ergebnisse, daß zumindest solche Wechselwirkung in den ersten Schritten der Fusion zwischen den TM und/oder CT Domänen der F- und HN-Proteine durch die von uns vorgenommene Substitution dieser Domänen des F-Proteins nicht beeinflusst worden ist. Alle verwendeten F-Protein-Chimären waren nach einer Co-Expression mit HN-Protein in der Lage, wenigstens eine Membranverschmelzung (aufgelöst durch R18-Übergang) zu vermitteln. Weitere Untersuchungen z. B. mit den SeV-F-Chimären und heterotypischen HN-Proteinen anderer Paramyxoviren könnten Aussagen über den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen den F- und HN-Proteinen geben.

Die Frage, ob zur Induktion der F-proteinvermittelten Membranfusion das HN-Protein notwendig ist, bleibt noch ungeklärt. Wahrscheinlich löst die Wechselwirkung des HN-Proteins mit dem F-Protein, die durch die Bindung des HN an zelluläre Rezeptoren und damit verbundenen Strukturänderung des HN-Proteins vermittelt wird, *in vivo* eine Konformationsumwandlung des F-Proteins aus. Diese Umwandlung der F-Proteinstruktur beinhaltet vermutlich eine Umorientierung der F2-Untereinheit und eine Abschwächung der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten F1 und F2, und dies ermöglicht wiederum eine Strukturänderung der F1-Untereinheit. Die Reorganisation der F2-Untereinheit muß nicht durch die Wechselwirkung mit dem HN-Protein, sondern kann z.B. durch eine Wechselwirkung mit spezifischen zellulären Rezeptoren oder mit der Targetmembran induziert werden. Es konnte festgestellt werden, daß nach einer Punktmutation in der Untereinheit F2 des F-Protein des SV5, Stamm WR, die Notwendigkeit des HN-Proteins zur Synzytiumbildung aufgehoben wurde, obwohl dieser Stamm des SV5 im Gegensatz zum Stamm W3A die Anwesenheit des HN-Proteins zur Induktion der Fusion benötigt (*Ito et al., 1997*). Daher ist das HN-Protein für das Auslösen der Strukturumwandlung des F-Proteins nicht notwendig. Das HN-Protein spielt jedoch eine Rolle bei der Membranfusion, nämlich die Förderung der Fusion durch die Akkumulierung der F-Proteine an der Kontaktstelle mit dem Target. Diese Funktion des HN-Proteins ist in bestimmten Untersuchungssystemen wie bei F-exprimierenden Zellen erforderlich.

Literaturverzeichnis

- Alkhatib, G., Richardson, C. and Shen, S.H. (1990) Intracellular processing, glycosylation and cell-surface expression of the measles virus fusion protein (F) encoded by a recombinant adenovirus.
Virology **175**, 262-270
- Almers, W. (1990) Exocytosis.
Annu. Rev. Physiol. **52**, 607-624
- Armstrong, T.R., Kushnir, A.S. and White, J. (2000) The transmembrane domain of influenza hemagglutinin exhibits a stringent length requirement to support the hemifusion to fusion transition.
J. Cell Biol. **151**, 425-437
- Aroeti, B. and Henis, Y.I. (1991) Accumulation of Sendai virus glycoproteins in cell-cell contact regions and its role in cell fusion.
J. Biol. Chem. **266**, 15845-15849
- Asano, K. and Asano, A. (1985) Why is a specific amino acid sequence of F glycoprotein required for the membrane fusion reaction between envelope of HVJ (Sendai virus) and target cell membranes?
Biochem. Int. **10**, 115-122
- Ashwell, G. and Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. (Review)
Annu. Rev. Biochem. **51**, 531-554
- Bagai, S., Puri, A., Blumenthal, R. and Sarkar, D.P. (1993) Hemagglutinin-Neuraminidase enhances F-Protein-mediated membrane fusion of reconstituted Sendai virus envelopes with cells.
J. Virol. **67**, 3312-3318
- Bagai, S. and Lamb, R.A. (1996) Truncation of the COOH-terminal region of the paramyxovirus SV5 fusion protein leads to hemifusion but not complete fusion.
J. Cell Biol. **135**, 73-84
- Bagai, S. and Lamb, R.A. (1997) A glycine to alanine substitution in the paramyxovirus SV5 fusion peptide increases the initial rate of fusion.
Virology **238**, 283-290
- Baker, K.A., Dutch, R.E., Lamb, R.A. and Jardetzky, T.S. (1999) Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion.
Mol. Cell **3**, 309-319

- Ben-Efraim, I., Kliger, Y., Hermesh, Ch. and Shai, Y. (1999) Membrane-induced step in the activation of Sendai virus fusion protein.
J. Mol. Biol. **285**, 609-625
- Bethell, R.C., Norman, M.G. and Penn, C.R. (1995) The kinetics of the acid-induced conformational change of Influenza virus Hemagglutinin can be followed using 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthylsulphonic acid).
Biochem. Biophys. Res. Commun. **206**, 355-361
- Bitzer, M., Lauer, U., Baumann, C., Spiegel, M., Gregor, M. and Neubert, W.J. (1997) Sendai virus efficiently infects cells via the asialoglycoprotein receptor and requires the presence of cleaved F-0 precursor proteins for this alternative route of cell entry.
J. Virol. **71**, 5481-5486
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification.
Can. J. Biochem. Physiol. **37**, 911-917
- Blumenthal, R., Bali-Puri, A., Walter, A., Corell, W. and Eidemann, O. (1987) pH-dependent fusion of Vesicular stomatitis virus with vero cells.
J. Biol. Chem. **262**, 13614-13619
- Böttcher, C.J.F., van Gent, C.M. and Pries, C. (1961) A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination.
Anal. Chim. Acta **24**, 203-204
- Böttcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., van Heel, M. and Stark, H. (1999) Structure of Influenza Hemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy.
FEBS Lett. **463**, 255-259
- Bousse, T., Takimoto, T., Gorman, W.L., Takahashi, T. and Portner, A. (1994) Regions on the Hemagglutinin-Neuraminidase proteins of Human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion.
Virology **204**, 506-514
- Bousse, T., Takimoto, T. and Portner, A. (1995) A single amino acid changes enhances the fusion promotion activity of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein.
Virology **209**, 654-657
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**, 248-254
- Brand, C.M. and Skehel, J.J. (1972) Crystalline antigen from the Influenza virus envelope.
Nat. New Biol. **238**, 145-147
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994) Structure of Influenza Hemagglutinin at the pH of membrane fusion.
Nature **371**, 37-43

- Calder, L.J., Gonzalez-Reyes, L., Garcia-Barreno, B., Wharton, S.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C. and Melero, J.A. (2000) Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies.
Virology **271**, 122-131
- Carr, C.M. and Kim, P.S. (1993) A spring-loaded mechanism for the conformational change of Influenza Hemagglutinin.
Cell **73**, 823-832
- Carr, C.M., Chaudhry, C. and Kim, P.S. (1997) Influenza Hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 14306-14313
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. and Kim, P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.
Cell **89**, 263-273
- Chen, J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1999) N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH Influenza Hemagglutinin HA2 subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 8967-8972
- Chen, L., Gorman, J.J., McKimm-Breschkin, J., Lawrence, L.J., Tulloch, P.A., Smith, B.J., Colman, P.M. and Lawrence, M.C. (2001) The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion.
Structure **9**, 255-266
- Chernomordik, L.V., Melikyan, G.B. and Chizmadzhev, Y.A. (1987) Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. (Review)
Biochim. Biophys. Acta **906**, 309-352
- Chernomordik, L.V., Vogel, S.S., Sokoloff, A., Onaran, H.O., Leikina, E.A. and Zimmerberg, J. (1993) Lysolipids reversibly inhibit Ca²⁺-dependent, GTP-dependent and pH-dependent fusion of biological membranes.
FEBS Lett. **318**, 71-76
- Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M. and Zimmerberg, J. (1995) Lipids in biological membrane fusion.
J. Membr. Biol. **146**, 1-14
- Chernomordik, L.V., Leikina, E., Frolov, V., Bronk, P. and Zimmerberg, J. (1997) An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of Influenza Hemagglutinin depends upon membrane lipids.
J. Cell Biol. **136**, 81-93
- Chernomordik, L.V., Leikina, E.A., Kozlov, M.M., Frolov, V. and Zimmerberg, J. (1999) Structural intermediates in influenza haemagglutinin-mediated fusion.
Mol. Membr. Biol. **16**, 33-42

- Connaris, H., Takimoto, T., Russell, R., Crennell, S., Moustafa, I., Portner, A. and Taylor, G. (2002) Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *J. Virol.* **76**, 1816-1824
- Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A. and Taylor, G. (2000) Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1068-1074
- D**alocchio, F., Tomasi, M. and Bellini, T. (1995) Activation of the Sendai virus fusion protein by receptor binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 36-41
- Daniels, R.S., Downie, J.C., Hay, A.J., Knossow, M., Skehel, J.J., Wang, M.L. and Wiley, D.C. (1985) Fusion mutants of the Influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* **40**, 431-439
- Deng, R., Wang, Z., Mirza, A.M. and Iorio, R.M. (1995) Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology* **209**, 457-469
- Dodge, J.T., Mitchell, C. and Hanahan, D.J. (1963) The preparation of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. biochem. Biophys.* **100**, 119-130
- Doms, R.W., Helenius, A. and White, J. (1985) Membrane fusion activity of the Influenza virus Hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **260**, 2973-2981
- Dong, J., Roth, M.G. and Hunter, E. (1992) A chimeric avian retrovirus containing the Influenza virus hemagglutinin gene has an expanded host range. *J. Virol.* **66**, 7374-7382
- Dutch, R.E., Bagai Joshi, S. and Lamb, R.A. (1998) Membrane fusion promoted by increasing surface densities of the paramyxovirus F and HN proteins: comparison of fusion reactions mediated by Simian virus 5 F, Human parainfluenza virus type 3 F, and Influenza virus HA. *J. Virol.* **72**, 7745-7753
- Dutch, R.E., Leser, G.P. and Lamb, R.A. (1999) Paramyxovirus fusion protein: Characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology* **254**, 147-159
- Dutch, R.E. and Lamb, R.A. (2001) Deletion of the cytoplasmic tail of the fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5 affects fusion pore enlargement. *J. Virol.* **75**, 5363-5369

Dutch, R.E., Hagglund, R.N., Nagel, M.A., Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (2001) Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology* **281**, 138-150

Ebata, S.N., Cote, M.J., Kang, C.Y. and Dimock, K. (1991) The fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins of human parainfluenza virus 3 are both required for fusion. *Virology* **183**, 437-441

Fujii, T. and Tamura, A. (1983) Dynamic behaviour of amphiphilic lipids to penetrate into membrane of intact human erythrocytes and to induce change in the cell shape. *Biomed. Biochim. Acta* **42**, 81-85

Gething, M.J., White, J.M. and Waterfield, M.D. (1978) Purification of the fusion protein of Sendai virus: Analysis of the NH₂-terminal sequence generated during precursor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 2737-2740

Gething, M.-J., Doms, R.W., York, D. and White, J. (1986) Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the Hemagglutinin of Influenza virus. *J. Cell Biol.* **102**, 11-23

Ghosh, J.K., Peisajovich, S.G. and Shai, Y. (2000) Sendai virus internal fusion peptide: structural and functional characterization and a plausible mode of viral entry inhibition. *Biochemistry*. **39**, 11581-11592

Godley, L., Pfeifer, J., Steinhauer, D., Ely, B., Shaw, G., Kaufmann, R., Suchanek, E., Pabo, C., Skehel, J.J., Wiley, D.C. and Wharton, S. (1992) Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity. *Cell* **68**, 635-645

Gonzalez-Reyes, L., Ruiz-Arguello, M.B., Garcia-Barreno, B., Calder, L., Lopez, J.A., Albar, J.P., Skehel, J.J., Wiley, D.C. and Melero, J.A. (2001) Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9859-9864

Gruenke, J.A., Armstrong, R.T., Newcomb, W.W., Brown, J.C. and White, J.M. (2002) New insights into the spring-loaded conformational change of influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* **76**, 4456-4466

Günther-Ausborn, S., Praetor, A. and Stegmann, T. (1995) Inhibition of influenza-induced membrane fusion by lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **270**, 29279-29285

Harter, C., James, P., Bachi, T., Semenza, G. and Brunner, J. (1989) Hydrophobic binding of the ectodomain of influenza hemagglutinin to membranes occurs through the „fusion peptide“. *J. Biol. Chem.* **264**, 6459-6464

- He, B., Lin, G.Y., Durbin, J.E., Durbin, R.D. and Lamb, R.A. (2001) The SH integral membrane protein of the paramyxovirus SV5 is required to block apoptosis in MDBK cells. *J. Virol.* **75**, 4068-4079
- Heminway, B.R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K.G., Gustafson, E., Bernstein, J.M. and Galinski, M.S. (1994) Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* **200**, 801-805
- Henis, Y. I., Herman-Barhom, Y., Aroeti, B. and Gutman, O. (1989) Lateral mobility of both envelope proteins (F and HN) of Sendai virus in the cell membrane is essential for cell-cell fusion. *J. Biol. Chem.* **264**, 17119-17125
- Hiebert, S.W., Richardson, C.D. and Lamb, R.A. (1988) Cell surface expression and orientation in membranes of the 44-amino-acid SH protein of simian virus 5. *J. Virol.* **62**, 2347-2357
- Hoekstra, D., de Boer, T., Klappe, K. and Wilschut, J. (1984) Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* **23**, 5675-5681
- Hoekstra, D., Novick, S.L., Hoff, H., Nir, S. and Klappe, K. (1989) Mechanisms of viral entry: Interaction of Sendai virus with biological and artificial membranes. in „*Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis*“ Alan R. Liss, Inc., 177-186
- Hoekstra, D. (1990) Membrane Fusion of Enveloped Viruses: Especially a Matter of Proteins. *J. of Bioenerg. Biomemb.* **22**, 121-155
- Homma, M. and Ohuchi, M. (1973) Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and in tissue culture cells. *J. Virol.* **12**, 1457-1465
- Horvath, C.M., Paterson, R.G., Shaughnessy, M.A., Wood, R. and Lamb, R.A. (1992) Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J. Virol.* **66**, 4564-4569
- Hrafnsdottir, S. and Menon, A.K. (2000) Reconstitution and partial characterization of phospholipid flippase activity from detergent extracts of the *Bacillus subtilis* cell membrane. *J. Bacteriol.* **182**, 4198-4206
- Hsu, M-Ch., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1979) Reconstitution of membranes with individual paramyxovirus glycoproteins and phospholipid in cholate solution. *Virology* **95**, 476-491
- Hsu, M., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1981) Activation of the Sendai virus fusion protein (F) involves a conformational change with exposure of a new hydrophobic region. *J. Biol. Chem.* **256**, 3557-3563

- Hsu, M.C., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1982) Enhancement of membrane-fusing activity of sendai virus by exposure of the virus to basic pH is correlated with a conformational change in the fusion protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **79**, 5862-5866
- Hu, X.L., Ray, R. and Compans, R.W. (1992) Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses.
J. Virol. **66**, 1528-1534
- Huang, Q., Opitz, R., Knapp, E.W. and Herrmann, A. (2002) Protonation and stability of the globular domain of influenza virus hemagglutinin.
Biophys. J. **82**, 1050-1058
- Huberman, K., Peluso, R.W. and Moscona, A. (1995) Hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza 3: role of the neuraminidase in the viral life cycle.
Virology **214**, 294-300
- Ito, M., Nishio, M., Kawano, M., Kusagawa, S., Komada, H., Ito, Y. and Tsurudome, M. (1997) Role of a single amino acid at the amino terminus of the simian virus 5 F2 subunit in syncytium formation
J. Virol. **71**, 9855-9858
- Ito, M., Nishio, M., Komada, H., Ito, Y. and Tsurudome, M. (2000) An amino acid in the heptad repeat 1 domain is important for the haemagglutinin-neuraminidase-independent fusing activity of simian virus 5 fusion protein.
J. Gen. Virol. **81**, 719-727
- Jahn, R. and Grubmüller, H. (2002) Membrane fusion. (Review)
Curr. Opinion Cell Biol. **14**, 488-495
- Jin, H., Leser, G.P. and Lamb, R.A. (1994) The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity.
EMBO J. **13**, 5504-5515
- Joshi, S.B., Dutch, R.E. and Lamb, R.A. (1998) A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41.
Virology **248**, 20-34
- Kemble, G.W., Bodian, D.L., Rose, J., Wilson, I.A. and White, J.M. (1992) Intermonomer disulfide bonds impair the fusion activity of influenza virus hemagglutinin.
J. Virol. **66**, 4940-4950
- Kemble, G.W., Danieli, T. and White, J.M. (1994) Lipid-anchored influenza Hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion.
Cell **76**, 383-391
- Klappe, K., Wilschut, J., Nir, S., and Hoekstra, D. (1986) Parameters affecting fusion between Sendai Virus and liposomes. Role of viral proteins, liposome composition and pH.
Biochem. **25**, 8252-8260

- Korte, T. and Herrmann, A. (1994) pH-Dependent binding of the fluorophore bis-ANS to influenza virus reflects the conformational change of hemagglutinin.
Eur. Bioph. J. **23**, 105-113
- Korte, T., Ludwig, K., Booy, F.P., Blumenthal, R. and Herrmann, A. (1999) Conformational intermediates and fusion activity of influenza virus hemagglutinin.
J. Virol. **73**, 4567-4574
- Kozerski, C., Ponimaskin, E., Schroth-Diez, B., Schmidt, M.F. and Herrmann, A. (2000) Modification of the cytoplasmic domain of influenza virus hemagglutinin affects enlargement of the fusion pore.
J. Virol. **74**, 7529-7537
- Kozlov, M.M., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Markin, V.S. and Chizmadzhev, Y.A. (1989) Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents.
Eur. Biophys. J. **17**, 121-129
- Lamb, R.A. (1993) Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes.
Virology **197**, 1-11
- Lamb, R.A., Bagai Joshi, S. and Dutch, R.E. (1999) The paramyxovirus fusion protein forms extremely stable core trimer: structural parallels to influenza virus haemagglutinin and HIV-1 gp41.
Mol. Memb. Biol. **16**, 11-19
- Lambert, D.M., Barney, S., Lambert, A.L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D.E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G. and Petteway, S.R. (1996) Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**, 2186-2191
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G., Wengler, G., Rey, F.A. (2001) The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH.
Cell **105**, 137-148
- Levine, A.J. (1993) Das Influenza-A-Virus.
in: *Viren: Diebe, Mörder und Piraten*. Spektrum Akademischer Verlag, 184
- Leyrer, S., Bitzer, M., Lauer, U., Kramer, J., Neubert, W.J. and Sedlmeier, R. (1998) Sendai virus-like particles devoid of Hemagglutinin-Neuraminidase protein infect cells via the human asialoglycoprotein receptor.
J. Genet. Virol. **79**, 683-687
- Lowry, O.H. , Rosenbrough, N.J. , Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Reagent.
J. Biol. Chem. **193**, 265

Lüneberg, J., Martin, I., Nüßler, F., Ruyschaert, J.M. and Herrmann, A. (1995) Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers.
J. Biol. Chem. **270**, 27606-27614

Ludwig, K. (2000) *Die dreidimensionale Struktur des Influenzavirus-Hämagglutinin im membranfusionsaktiven Zustand*. (Dissertation)
Humboldt-Universität zu Berlin; Berlin

Markosyan, R.M., Cohen, F.S. and Melikyan, G.B. (2000) The lipid-anchored ectodomain of influenza virus hemagglutinin (GPI-HA) is capable of inducing nonenlarging fusion pores.
Mol. Biol. Cell **11**, 1143-1152

Markwell, M.A. and Fox, C.F. (1980) Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking.
J. Virol. **33**, 152-166

Markwell, M.A.K., Portner, A. and Schwartz, A.L. (1985) An alternative route of infection for viruses: Entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking its attachment protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **82**, 978-982

Melikyan, G.B., White, J.M. and Cohen, F.S. (1995) GPI-anchored influenza hemagglutinin induces hemifusion to both red blood cell and planar bilayer membranes.
J. Cell Biol. **131**, 679-691

Melikyan, G.B., Lin, S., Roth, M.G. and Cohen, F.S. (1999) Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion.
Mol. Biol. Cell **10**, 1821-1836

Morrot, G., Herve, P., Zachowski, A., Fellmann, P. and Devaux, P.F. (1989) Aminophospholipid translocase of human erythrocytes: phospholipid substrate specificity and effect of cholesterol.
Biochemistry **28**, 3456-3462

Moscona, A. and Peluso, R.W. (1991) Fusion properties of cells persistently infected with human parainfluenza virus type 3: participation of hemagglutinin-neuraminidase in membrane fusion.
J. Virol. **65**, 2773-2777

Nakanishi, M., Uchida, T., Kim, J. and Okada, Y. (1982) Glycoproteins of Sendai virus (HVJ) have a critical ratio for fusion between virus envelopes and cell membranes.
Exp. Cell Res. **142**, 95-101

Novick, S.L. and Hoekstra, D. (1988) Membrane penetration of Sendai virus glycoproteins during the early stages of fusion with liposomes as determined by hydrophobic photoaffinity labeling.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **85**, 7433-7437

Nüßler, F., Clague, M.J. and Herrmann, A. (1997) Meta-stability of the hemifusion intermediate induced by glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin. *Biophys. J.* **73**, 2280-2291

Parks, G.D. and Lamb, R.A. (1990) Folding and oligomerization properties of a soluble and secreted form of the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology* **178**, 498-508

Paterson, R.G., Hiebert, S.W. and Lamb, R.A. (1985) Expression at the cell surface of biologically active fusion and hemagglutinin/neuraminidase proteins of the paramyxovirus simian virus 5 from cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7520-7524

Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (1987) Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a paramyxovirus F protein to act as a membrane anchor. *Cell* **48**, 441-452

Paterson, R.G., Shaughnessy, M.A. and Lamb, R.A. (1989) Analysis of the relationship between cleavability of a paramyxovirus fusion protein and length of the connecting peptide. *J. Virol.* **63**, 1293-1301

Peisajovich, S.G., Samuel, O. and Shai, Y. (2000) Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion. *J. Mol. Biol.* **296**, 1353-1365

Peisajovich, S.G. and Shai, Y. (2002) New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 183-190

Ponimaskin, E. and Schmidt, M.F.G. (1998) Domain-structure of cytoplasmic border region is main determinant for palmitoylation of influenza virus hemagglutinin (H7). *Virology* **249**, 325-335

Prehm, P., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1979) The carbohydrate structure of the glycoproteins of the paramyxovirus SV5 grown in bovine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 9669-9677

Qiao, H., Pelletier, S.L., Hoffman, L., Hacker, J., Armstrong, R.T. and White, J.M. (1998) Specific single or double proline substitutions in the „spring-loaded“ coiled-coil region of the influenza hemagglutinin impair or abolish membrane fusion activity. *J. Cell Biol.* **141**, 1335-1347

Rapaport, D. and Shai, Y. (1994) Interaction of fluorescently labeled analogues of the amino-terminal fusion peptide of Sendai virus with phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 15124-15131

- Rapaport, D., Ovadia, M. and Shai, Y. (1995) A synthetic peptide corresponding to a conserved heptad repeat domain is a potent inhibitor of Sendai virus-cell fusion: An emerging similarity with functional domains of other viruses.
EMBO J. **14**, 5524-5531
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C. and Harrison, S.C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution.
Nature **375**, 291-298
- Roth, M.G., Doyle, C., Sambrook, J. and Gething, M.J. (1986) Heterologous transmembrane and cytoplasmic domains direct functional chimeric influenza virus hemagglutinins into the endocytic pathway.
J. Cell Biol. **102**, 1271-1283
- Ruiz-Arguello, M., Gonzalez-Reyes, L., Calder, L.J., Palomo, C., Martin, D., Saiz, M.J., Garcia-Barreno, B., Skehel, J.J. and Melero, J.A. (2002) Effect of proteolytic processing at two distinct sites on shape and aggregation of an anchorless fusion protein of human respiratory syncytial virus and fate of the intervening segment.
Virology **298**, 317-326
- Russell, R., Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (1994) Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein.
Virology **199**, 160-168
- Sakai, Y. and Shibuta, H. (1989) Syncytium formation by recombinant vaccinia viruses carrying bovine parainfluenza 3 virus envelope protein genes.
J. Virol. **63**, 3661-3668
- Samuel, O. and Shai, Y. (2001) Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses.
Biochemistry **40**, 1340-1349
- Scheid, A., Caliguri, L.A., Compans, R.W. and Choppin, P.W. (1972) Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SV5 glycoprotein.
Virology **50**, 640-652
- Scheid, A. and Choppin, P.W. (1974) Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus.
Virology **57**, 475-490
- Scheid, A. and Choppin, P.W. (1977) Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses.
Virology **80**, 54-66

- Schroth-Diez, B., Ponimaskin, E., Reverey, H., Schmidt, M.F. and Herrmann, A. (1998) Fusion activity of transmembrane and cytoplasmic domain chimeras of the influenza virus glycoprotein hemagglutinin.
J. Virol. **72**, 133-141
- Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q. and Herrmann, A. (2000) The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses.
Biosci. Rep. **20**, 571-595
- Sechoy, O., Philippot, J.R. and Bienvenue, A. (1987) F protein-F protein interaction within the Sendai virus identified by native bonding or chemical cross-linking.
J. Biol. Chem. **262**, 11519-11523
- Sergel, T., McGinnes, L.W. and Morrison, T.G. (1993) The fusion promotion activity of the NDV HN protein does not correlate with neuraminidase activity.
Virology **196**, 831-834
- Sergel, T. and Morrison, T.G. (1995) Mutations in the cytoplasmic domain of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus depress syncytia formation.
Virology **210**, 264-272
- Simpson, D.A. and Lamb, R.A. (1992) Alterations to influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail modulate virus infectivity.
J. Virol. **66**, 790-803
- Spruce, A.E., Iwata, A. and Almers, W. (1991) The first milliseconds of the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during membrane fusion.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **88**, 3623-3627
- Stegmann, T., Hoekstra, D., Scherphof, G. and Wilschut, J. (1986) Fusion activity of influenza virus. A comparison between biological and artificial target membrane vesicles.
J. Biol. Chem. **261**, 10966-10969
- Stegmann, T., Delfino, J.M., Richards, F.M. and Helenius, A. (1991) The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion.
J. Biol. Chem. **266**, 18404-18410
- Stegmann, T. and Helenius, A. (1993) Influenza Virus Fusion: From Models Toward a Mechanism.
in: *Viral Fusion Mechanisms* ed. by J. Bentz, CRC Press, Inc., 89-111
- Steinhauer, D.A., Wharton, S.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1995) Studies of the membrane fusion activities of fusion peptide mutants of influenza virus hemagglutinin.
J. Virol. **69**, 6643-6651
- Stone-Hulslander, J. and Morrison, T.G. (1997) Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells.
J. Virol. **71**, 6287-6295

Stuart, D. (1994) Virus structure. Docking mission accomplished.
Nature **371**, 19-20

Takimoto, T., Taylor, G.L., Connaris, H.C., Crennell, S.J. and Portner, A. (2002) Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion.
J. Virol. **76**, 13028-13033

Tanabayashi, K. and Compans, R.W. (1996) Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins: Identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion.
J. Virol. **70**, 6112-6118

Tomasi, M. and Loyer, A. Selective extraction of biologically active F-Glycoprotein from Dithiothreitol reduced Sendai virus particles.
FEBS Lett. **131**, 381-385

Tong, S. and Compans, R.W. (1999) Alternative mechanisms of interaction between homotypic and heterotypic parainfluenza virus HN and F proteins.
J. Gen. Virol. **80**, 107-115

Tse, F.W., Iwata, A. and Almers, W. (1993) Membrane Flux Through the Pore Formed by a Fusogenic Viral Envelope Protein During Cell Fusion.
J. Cell Biol. **121**, 543-552

Tsurudome, M., Kawano, M., Yuasa, T., Tabata, N., Nishio, M., Komada, H. and Ito, Y. (1995) Identification of regions on the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 2 important for promoting cell fusion.
Virology **213**, 190-203

Tsurudome, M., Ito, M., Nishio, M., Kawano, M., Okamoto, K., Kusagawa, S., Komada, H. and Ito, Y. (1998) Identification of regions on the fusion protein of human parainfluenza virus type 2 which are required for haemagglutinin-neuraminidase proteins to promote cell fusion.
J. Gen. Virol. **79**, 279-289

Tsurudome, M., Ito, M., Nishio, M., Kawano, M., Komada, H. and Ito, Y. (2001) Hemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity of simian virus 5 fusion (F) protein: difference in conformation between fusogenic and nonfusogenic F proteins on the cell surface.
J. Virol. **75**, 8999-9009

Varghese, J.N., Laver, W.G. and Colman, P.M. (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution.
Nature **303**, 35-40

Vogel, S.S., Leikina, E.A. and Chernomordik, L.V. (1993) Lysophosphatidylcholine reversibly arrests exocytosis and viral fusion at a stage between triggering and membrane merger.
J. Biol. Chem. **268**, 25764-25768

- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.
Nature **387**, 426-430
- Weissenhorn, W., Calder, L.J., Wharton, S.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1998) The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**, 6032-6036
- Wiley, D.C. and Skehel, J.J. (1987) The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. (Review)
Annu. Rev. Biochem. **56**, 365-394
- Wilson, I.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.
Nature **289**, 366-373
- Wharton, S.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (2000) Temperature dependence of fusion by sendai virus.
Virology **271**, 71-78
- Wharton, S.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1986) Studies of influenza haemagglutinin-mediated membrane fusion.
Virology **149**, 27-35
- White, J., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (1982) Membrane fusion activity of influenza virus.
EMBO J. **1**, 217-222
- White, J.M. (1990) Viral and cellular membrane fusion proteins.
Annu. Rev. Physiol. **52**, 675-697
- White, J.M. (1992) Membrane fusion.
Science **258**, 917-924
- White, J.M. (1995) Membrane fusion: The influenza paradigm.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **60**, 581-587
- Yeagle, P.L., Smith, F.T., Young, J.E. and Flanagan, T.D. (1994) Inhibition of membrane fusion by lysophosphatidylcholine.
Biochem. **33**, 1820-1827
- Yoshima, H., Nakanishi, M., Okada, Y. and Kobata, A. (1981) Carbohydrate structures of HVJ (Sendai Virus) glycoproteins.
J. Biol. Chem. **256**, 5355-5361
- Young, J.K., Li, D., Abramowitz, M.C. and Morrison, T.G. (1999) Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions.
J. Virol. **73**, 5945-5956

Yu, M., Wang, E., Liu, Y., Cao, D., Jin, N., Zhang, C.W., Bartlam, M., Rao, Z., Tien, P. and Gao, G.F. (2002) Six-helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from the F protein of Newcastle disease virus.
J. Gen. Virol. **83**, 623-629

Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V.N. and Kim, P.S. (2000) Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**, 14172-14177

Anhang

- Danksagung
- Publikationen
- Erklärung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. A. Herrmann. Ich möchte ihm für die Überlassung meines Promotionsthemas und die kontinuierliche Bereitschaft zur Diskussion danken. Ich konnte während dieser Zeit sehr viel von ihm lernen. Nicht nur seine fachlichen Beiträge, sondern auch seine Fähigkeit auf nichtfachliche Belange einzugehen, halfen mir durch die Hochs und Tiefs im Laboralltag.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Aufklärung der 3D-Struktur des F-Proteins wurden von Dr. Christoph Böttcher und Dr. Kai Ludwig durchgeführt. Nicht nur dafür möchte ich mich bei ihnen bedanken, sondern auch für ihr permanentes Engagement und die geduldige Beantwortung vieler Fragen.

Bei Prof. M.F.G. Schmidt und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Immunologie und Molekularer Biologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin möchte ich mich ganz herzlich für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit danken. Bei Frau Poesche erlernte ich Methoden der Plasmidzucht. Dr. E. Ponimaskin und Corinna Weber stellten mir für meine Versuche die Plasmide der F-Chimären zur Verfügung.

Ich danke Frau Bärbel Hillebrecht sowohl für ihre unverzichtbare Unterstützung bei der Viruszucht als auch für ihre große Hilfe bei technischen oder methodischen Problemen.

Weiterhin möchte ich mich bei Nina Ohlwein und Stefanie Vehring für die zeitaufwendige Zucht des SV5 bedanken. Außerdem übernahm Nina Ohlwein die Temperatur- und pH-Abhängigkeitsmessungen. Für ihren enthusiastischen Einsatz danke ich ihr ganz herzlich.

Bei molekularbiologischen Problemen standen mir Dr. Christine Kozerski und Krishna P. Radchakonda stets zur Seite. Dafür danke ich ihnen.

Bei Dr. Thomas Korte, Astrid Tannert, Janek Kubelt bedanke ich mich herzlichst für die Korrektur und Anmerkungen des Manuskripts.

Frau Dr. Alexa Greube führte mich in die Methoden der Säulenchromatographie ein, außerdem stand sie mir stets bei Elektrophoreseproblemen mit guten Ratschlägen bei. Nicht nur dafür danke ich ihr vom ganzen Herzen.

Frau Angela Piater war stets bei organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten eine große Hilfe.

Der ganzen Arbeitsgruppe "Molekulare Biophysik" möchte ich für die kreative und familiäre Atmosphäre danken, die mir manche langwierigen Versuche erleichtert hat. Insbesondere war es Dr. Peter Müller, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und der durch seine humorvolle Art seelische Unterstützung gab. Maria Ploog, Dr. Antje Pohl, Dr. Britta Schroth-Diez, Frau Sabine Schiller danke ich für ihre tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung nicht nur im Laboralltag, sondern auch im Privaten.

Ich danke dem Studienwerk der Heinrich-Böll-Stiftung, das meine Promotionsarbeit finanziell unterstützt hat. Das letzte Halbjahr meiner Promotion wurde vom „Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in der Forschung und Lehre“ finanziert.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders meinem Mann Odzorig für die Geduld und Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Publikationen

Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, Ch., Huang, Q. and Herrmann, A. (2000). The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. (Mini review) Bioscience Reports 20: 571-595

Baljinnyam, B., Schroth-Diez, B., Korte, T. and Herrmann, A. (2002) Lysolipids do not inhibit influenza virus fusion by interaction with hemagglutinin. J. Biol. Chem. 277 (23): 20461-20467

Ludwig, K., Baljinnyam, B., Herrmann, A. and Böttcher, Ch. (2002) The 3D structure of the fusion primed Sendai F-protein. EMBO J. (eingereicht)

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 20.12.2002